

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**FRANCINE BITTENCOURT POTRICH**

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO BRUTO  
HIDROALCOÓLICO DA *Achillea millefolium* L.: ENVOLVIMENTO DO  
SISTEMA ANTIOXIDANTE.**

**CURITIBA  
2009**

**FRANCINE BITTENCOURT POTRICH**

**ATIVIDADE GASTROPROTETORA DO EXTRATO BRUTO  
HIDROALCOÓLICO DA *Achillea millefolium* L.: ENVOLVIMENTO DO  
SISTEMA ANTIOXIDANTE.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Consuelo Andrade Marques

Co-orientadora: Dra. Maria Fernanda de Paula Werner

**CURITIBA  
2009**

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	1
1.1 <i>Achillea millefolium</i> L.	3
1.2 Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal (TGI)	6
1.3 Regulação fisiológica da secreção ácida gástrica	9
1.4 Fatores envolvidos na integridade da mucosa gástrica	12
1.5 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e enzimas antioxidantes	16
1.6 Úlcera péptica	19
1.7 Cicatrização da úlcera	21
1.8 Farmacoterapêutica da úlcera péptica	22
<b>2. OBJETIVO</b>	24
2.1 Objetivo geral	24
2.2 Objetivos específicos	24
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	25
3.1 Coleta e identificação do material botânico	25
3.2 Métodos fitoquímicos	25
3.2.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA)	25
3.3 Animais	26
3.4 Métodos farmacológicos “ <i>in vivo</i> ”	26
3.4.1 Indução de lesão gástrica aguda induzida pelo etanol em ratos	26
3.4.2 Indução de lesão gástrica crônica pelo ácido acético em ratos	27
3.5 Métodos farmacológicos “ <i>in vitro</i> ”	28
3.5.1 Preparação das amostras para as análises enzimáticas e não enzimáticas	28
3.5.2 Estudo “ <i>in vitro</i> ” da atividade do EBHA como sequestrador do radical livre 2,2–difetil 1- picrilhidrazil (DPPH)	28
3.5.3 Quantificação do conteúdo de GSH na região glandular do estômago	29
3.5.4 Quantificação da atividade da SOD na região glandular do estômago	29
3.5.5 Quantificação da atividade da CAT na região glandular do estômago	30
3.5.6 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	31

3.5.7 Análise histológica .....	31
3.5.8 Análise estatística .....	32
<b>4. RESULTADOS</b> .....	34
4.1 Efeito do EBHA em lesões gástrica induzidas pelo etanol P.A .....	34
4.2 Efeito do EBHA sobre o sequestro do radical livre 2,2 – difenil 1- picrilhidrazil (DPPH) .....	35
4.3 Efeito do EBHA sobre o conteúdo de GSH na região glandular do estômago após indução de lesão pelo etanol P.A.....	36
4.4 Efeito do EBHA sobre a atividade da SOD na região glandular do estômago após indução de lesão pelo etanol P.A.....	37
4.5 Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular do estômago após indução de lesão pelo etanol P.A.....	38
4.6 Efeito do EBHA em lesões gástricas induzidas pelo ácido acético 80% .....	39
4.7 Análise histológica das úlceras gástricas após lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80%.....	40
4.8 Efeito do EBHA sobre os níveis de GSH na região glandular do estômago após lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80% .....	41
4.9 Efeito do EBHA sobre a atividade da SOD na região glandular do estômago após lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80%.....	42
4.10 Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular do estômago após lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80%.....	43
4.10 Efeito do EBHA sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) após indução de lesão gástrica pelo ácido acético 80% .....	44
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	45
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	55
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	56

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Ilustração da <i>Achillea millefolium</i> .....	4
<b>Figura 2</b> - Efeito gastroprotetor do EBHA em lesões gástricas induzidas por etanol P.A.....	34
<b>Figura 3</b> - Efeito do EBHA no seqüestro do radical livre DPPH.....	35
<b>Figura 4</b> - Efeito do EBHA sobre o conteúdo de GSH na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol P.A.....	36
<b>Figura 5</b> - Efeito do EBHA sobre a atividade da SOD na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol P.A.....	37
<b>Figura 6</b> - Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol P.A.....	38
<b>Figura 7</b> – Efeito gastroprotetor do EBHA em lesões gástricas induzidas pelo ácido acético 80%.....	39
<b>Figura 8</b> - Efeito do tratamento com o EBHA sobre a regeneração da mucosa gástrica após lesão induzida pelo ácido acético 80%.....	40
<b>Figura 9</b> – Efeito do EBHA sobre o conteúdo de GSH na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético 80%.....	41
<b>Figura 9</b> – Efeito do EBHA sobre a atividade da SOD na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético 80%.....	42
<b>Figura 10</b> - Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80%.....	43
<b>Figura 11</b> – Efeito do EBHA sobre a atividade da MPO.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ❖ AA – Ácido ascórbico
- ❖ AAS – Ácido acetil salicílico
- ❖ ACh – Acetilcolina
- ❖ AINEs – Anti-inflamatórios não esteroidais
- ❖ AMPc – Adenosina monofosfato cíclico
- ❖ CAT - Catalase
- ❖ CCK-2 – Colecistocinina 2
- ❖ COX - Ciclooxigenase
- ❖ COX-1 – Ciclooxigenase 1
- ❖ COX-2 – Ciclooxigenase 2
- ❖ COX-3 – Ciclooxigenase 3
- ❖ DPPH – 2,2-difenil 1-picrilhidrazil
- ❖ DTNB – 5,5-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico
- ❖ EBHA – Extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium*
- ❖ ECL – Célula enterocromoafim
- ❖ EROs – Espécies reativas derivadas de oxigênio
- ❖ GCs – Guanilil ciclase solúvel
- ❖ GMPc – Guanilil monofosfato cíclico
- ❖ GPx – Glutathione peroxidase
- ❖ GSH – Glutathione reduzida
- ❖ GS-NP – Grupos sulfidrílicos não protéicos
- ❖ GSSH – Glutathione oxidada
- ❖ GTP – guanilil trifosfato
- ❖ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio
- ❖ HTAB – Hexadeciltrimetilamonio bromide
- ❖ IBP – Inibidores da bomba de prótons
- ❖ ip – via intraperitoneal
- ❖ L-NMMA – N<sup>G</sup>-monometil L-arginina
- ❖ MPO - Mieloperoxidase
- ❖ NADPH oxidase – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido oxidase
- ❖ NO – Óxido nítrico
- ❖ NOS – Óxido nítrico sintase

- ❖ eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
- ❖ iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
- ❖ nNOS - Óxido nítrico sintase neuronal
- ❖ Omep - Omeprazol
- ❖  $\bullet\text{OH}$  – Radical hidroxila
- ❖  $\text{O}_2$  – Oxigênio molecular
- ❖  $\text{O}_2^{\bullet-}$  - Ânion radical superóxido
- ❖ PG – Prostaglandina
- ❖  $\text{PGE}_2$  – Prostaglandina  $\text{E}_2$
- ❖  $\text{PGG}_2$  – Prostaglandina  $\text{G}_2$
- ❖  $\text{PGH}_2$  - Prostaglandina  $\text{H}_2$
- ❖  $\text{PGI}_2$  – Prostaciclina
- ❖ PKA - Proteína quinase A
- ❖ SNC – Sistema nervoso central
- ❖ SNE – Sistema nervoso entérico
- ❖ SOD – Superóxido dismutase
- ❖ TGI – Trato gastrointestinal
- ❖ TMB – Tetrametilbenzidina
- ❖ vo – via oral

## RESUMO

A *Achillea millefolium* L. é conhecida como mil folhas, utilizada popularmente para o tratamento de diversas patologias, incluindo distúrbios gástricos. Suas ações farmacológicas são atribuídas à presença de lactonas sesquiterpênicas, azulena e flavonóides, conhecidos por sua ação antioxidante. Estudos anteriores mostraram que o extrato aquoso da *Achillea millefolium* causou: potente efeito anti-secretor gástrico (basal e estimulado por histamina ou betanecol) o qual foi atribuído a inibição da  $H^+/K^+ATPase$ ; redução de úlceras gástricas induzida por etanol, indometacina e ácido acético. Além disso, esse mesmo extrato foi capaz de aumentar os níveis de GSH na mucosa gástrica de ratos submetidos à lesão aguda por etanol. Neste trabalho nós avaliamos a atividade gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* (EBHA), em modelos de lesão gástrica aguda (induzida pelo etanol P.A.) e crônica (induzida pelo ácido acético 80%) em ratos, e a sua atividade antioxidante “*in vitro*” e “*in vivo*”. Além disso, foi investigado se o EBHA era capaz de reduzir os níveis de mieloperoxidase (MPO) em estômagos submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético. Através de um modelo “*in vitro*”, observamos que o EBHA é capaz de sequestrar o radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), confirmando sua ação antioxidante. O pré-tratamento com o EBHA preveniu a formação de lesão gástrica induzida pelo etanol e reverteu a redução dos níveis do conteúdo de glutathiona (GSH) e da atividade da superóxido dismutase (SOD), e o aumento da atividade da catalase (CAT), alterações geradas pelo etanol. Da mesma forma, o tratamento com o EBHA foi capaz de melhorar a cicatrização de úlceras gástricas induzidas pelo ácido acético, promovendo significativa regeneração da mucosa gástrica. Semelhantemente ao etanol, o ácido acético promoveu uma redução dos níveis de GSH e da atividade da SOD, e aumento da atividade da CAT, que também foram revertidas pelo tratamento com o EBHA. Finalmente, nós observamos que o EBHA foi capaz de diminuir completamente os níveis de MPO em estômagos submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético, indicando uma redução da infiltração de neutrófilos. Os resultados obtidos indicam que o EBHA tem atividade gastroprotetora em modelos agudo e crônico e capacidade de promover melhora do processo de re-epitelização da mucosa gástrica. Sugerimos que esta ação envolve em parte, o restabelecimento dos mecanismos antioxidantes (GSH, SOD e CAT) e a redução da infiltração de neutrófilos no local da lesão. Porém, estudos



complementares devem ser realizados para um melhor entendimento da ação gastroprotetora da *Achillea millefolium*.

## ABSTRACT

*Achillea millefolium* L., also known as Yarrow, is a plant popularly used in the treatment of several pathologies, including gastric disorders. This plant contains fenolic compounds (flavonoids and fenolic acid), and its pharmacological actions are attributed to the presence of sesquiterpene lactones, azulene and flavonoids, well known for their antioxidant properties. Previous studies demonstrated that the *Achillea millefolium* aqueous extract caused a strong gastric anti-secretor effect (basal and histamine- or betanecol-stimulated), which was attributed to the inhibition of  $H^+/K^+ATPase$ ; reduction of gastric ulcers induced by ethanol, indometacine and acetic acid; as well as absence of hematological, hepatic and renal toxicity. Furthermore, this same extract increased the levels of the GSH in the gastric mucosa of rats submitted to acute lesion by ethanol. In this work, we evaluated the gastroprotective property of the hydroalcoholic crude extract of *Achillea millefolium* (EBHA) in acute (induced by ethanol P.A.) and chronic (induced by acetic acid 80%) gastric lesion rat models, and its antioxidant activity “*in vitro*” and “*in vivo*”. Besides, we investigated whether EBHA could reduce the levels of mieloperoxidase (MPO) in stomachs submitted to gastric lesion induced by acetic acid. At first, through an “*in vitro*” model, we observed that EBHA is able to sequester the radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), confirming its antioxidant action. The pretreatment with EBHA prevented the formation of gastric lesion induced by ethanol and reverted the reduction of GSH levels and SOD activity, and the increased of CAT activity, which are ethanol-induced alterations. The EBHA treatment was also able to improve the healing of gastric ulcers induced by acetic acid, promoting a reduction in the GSH levels and SOD activity, and the increased of CAT activity, which was also reverted by the treatment with EBHA. Finally, we observed that EBHA completely inhibited the levels of MPO in stomachs submitted to gastric lesion induced by acetic acid, indicating a reduction of neutrophil infiltration. The results obtained indicate that EBHA has gastroprotective activity in acute and chronic models, as well as it is able to improve the gastric mucosa reepitelization process. This is suggestive that such action involves, partially, the reestablishment of antioxidant mechanisms (GSH, SOD and CAT) and the reduction of neutrophil infiltration at the lesion site. Nevertheless, further studies must be carried on for a better understanding of the gastroprotective property of *Achillea millefolium*.

## 1. INTRODUÇÃO

Existem relatos fósseis do uso de plantas como ferramenta medicinal pelos seres humanos que datam de mais de 60 mil anos atrás (FABRICANT, FARENSWORTH, 2001). Fontes sobre o uso de plantas como medicamento foram reveladas pelos papiros egípcios (2.000 a.C.), dentre os quais, encontram-se os papiros de Ebers e Smith dedicados a questões de medicina e cirurgia. Ainda, os gregos Hipócrates (considerado o pai da medicina) e Dioscórides, deixaram legados sobre a prática médica e as drogas utilizadas na época para a cura dos males (FONT QUER, 1988).

Evidentemente, o maior fascínio no estudo sobre plantas medicinais está na origem desse conhecimento, ou seja, sobre como o homem da antiguidade com pouquíssimos recursos descobriu as propriedades terapêuticas das plantas e também de outras fontes naturais. Uma das possíveis formas de aprendizado do homem antigo seria a observação do comportamento dos animais na natureza. Na obra de FONT QUER (1988), o autor cita uma fábula que descreve a descoberta do efeito estimulante do café, em que cabras que comiam frutos da *Coffea arabica* ficavam muito excitadas, corriam e pulavam com muita exaltação. Nesta mesma obra o autor faz uma citação de Paracelso, na qual, o mesmo diz que todos os vegetais trazem em si evidências sobre suas propriedades terapêuticas. Assim, em uma observação mais atenta as plantas (em termos de morfologia interna e externa e habitat) mostrariam as suas virtudes. Existem vários exemplos que podem ser citados sobre a teoria de Paracelso, que sugeririam sua utilização para determinados males, como: as nozes eficazes para problemas do sistema nervoso central, o feijão para problemas renais, plantas com látex para a amamentação, entre outros (FONT QUER, 1988).

No final do século XVIII e início do século XIX, a química foi instituída como disciplina científica moderna. Além disso, a medicina e a química estavam entrelaçadas, possibilitando o desenvolvimento de conhecimentos específicos. Alguns potentes fármacos foram descobertos a partir de plantas e muitos deles são utilizados até hoje. Alguns exemplos incluem a morfina, isolada da *Papaver somniferum* por Setürner, em 1803, que era utilizada para acalmar a dor visceral; a efedrina, isolada da *Ephedra sinica*, em 1887, planta conhecida pelos chineses há 2.800 anos A.C.; a salicina, isolada da *Salix alba* em 1828, planta utilizada durante milênios na Europa, Ásia e África para combater febre e dor, a qual, posteriormente, teve o grupo hidroxila acetilado, produzindo, assim, o ácido acetil salicílico (AAS), o analgésico mais vendido no mundo (YUNES e FILHO, 2001), entre outros exemplos que poderiam ser citados.

Todos esses relatos foram e são de grande importância para o processo evolutivo do conhecimento humano sobre as atividades terapêuticas das espécies vegetais e, atualmente, esses conhecimentos são de grande valia, visto que a indústria farmacêutica tem grande interesse no desenvolvimento de pesquisas envolvendo produtos naturais, utilizando os princípios ativos como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (MARTINS *et al.*, 2004; SEIDL, 1999).

Além disso, o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo com mais de 55.000 espécies catalogadas (DIAS, 1996) de um total estimado em 350 a 550 mil espécies (NODARI e GUERRA, 2000). Esses dados mostram de forma concreta o potencial botânico que o Brasil tem em relação à descoberta de novos princípios ativos e ao desenvolvimento de novos medicamentos a partir de plantas.

O estudo de plantas medicinais que apresentam ação sobre o trato gastrointestinal assume grande importância em nossa sociedade atual, visto que os medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento desses distúrbios apresentam

alguns efeitos colaterais. O uso de antiácidos pode causar constipação ou diarreia nos pacientes, e o uso crônico de drogas antissecretoras tais como, os antagonistas de receptores  $H_2$  e os inibidores da bomba de prótons  $H^+K^+/ATPase$  podem gerar problemas como gastrinemia. Além disso, em estudo realizado por ARRAIS e colaboradores (1997), foi demonstrado que a procura por medicamentos que tenham ação sobre o aparelho digestivo e o metabolismo é de 24%, indicando que grande parte da população sofre de distúrbios gástricos, existindo grande necessidade de fármacos que apresentem menos efeitos colaterais e maior eficácia.

Neste contexto, o Laboratório de Toxicologia de Produtos Naturais do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, busca a validação de produtos naturais que tenham atividades sobre distúrbios relacionados ao trato gastrointestinal, utilizando para isso, metodologias internacionalmente padronizadas.

### **1.1 *Achillea millefolium***

A *Achillea millefolium* (Figura 1) é uma planta da família ASTERACEAE, conhecida popularmente como “mil-folhas” sendo utilizada pela população há mais de 3000 anos (MITICH, 1990). A origem da nomenclatura científica do gênero ao qual essa planta pertence é proveniente do Troiano Achilles, que fazia o seu uso para o tratamento de feridas adquiridas durante a guerra; e o adjetivo “*millefolium*” foi dado diante da característica das divisões das folhas, que confere o aspecto de “mil folhas” (BENEDEK e KOOP, 2007). Além de seu uso ornamental, é empregada na medicina tradicional como diurética, antiinflamatória, antiespasmódica, cicatrizante, indisposição, diarreia, contra hemorróidas, dispepsia, febre e como auxiliar no tratamento de gota (LORENZI e MATTOS, 2002).



**Painel A**

**Painel B**

**Figura 1.** Ilustração da *Achillea millefolium* L., disponíveis nos sites abaixo. Último acesso: 28/07/09.

Fonte:

**Painel A:** [http://students.umf.maine.edu/~adleyjf/Achillea\\_millefolium\\_20041012\\_2574.jpg](http://students.umf.maine.edu/~adleyjf/Achillea_millefolium_20041012_2574.jpg)

**Painel B:**

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Illustration\\_Achillea\\_millefolium0.jpg/300px-Illustration\\_Achillea\\_millefolium0.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/be/Illustration_Achillea_millefolium0.jpg/300px-Illustration_Achillea_millefolium0.jpg)

A *Achillea millefolium* contém compostos fenólicos, bem como flavonóides e ácido fenólico e suas ações farmacológicas são atribuídas à presença de lactonas sesquiterpênicas, azuleno (principal constituinte do óleo essencial) e flavonóides. Os flavonóides são de grande importância, visto que são conhecidos por suas ações espasmolítica, colorética, antimicrobiana e antioxidativa (KOCEVAR, *et al.*, 2008). Algumas flavonas e flavonóides já foram isolados e ocorrem como mono e diglicosídeos de apigenina, luteolina, quercetina e rutina (KOCEVAR, *et al.*, 2008; BENEDEK e KOOP, 2007). Em uma análise realizada com amostras comerciais de “mil-folhas” foi demonstrada a presença de 0,6% de flavonóides e 1,48% de ácidos fenólicos (BENEDEK, 2007). Estudos realizados com o extrato metanólico da *Achillea millefolium* demonstraram um potente efeito antioxidante com capacidade de sequestrar

o radical 2,2- difenil 1- picrilhidrazil (DPPH), superóxido e radical hidroxila; além de inibir a formação da peroxidação lipídica (CANDAN, *et al.*, 2003).

Além disso, várias preparações da *Achillea millefolium* têm sido estudadas em diversos modelos experimentais, apresentando uma variedade de atividades biológicas que corroboram com o uso popular.

TARIQ, e colaboradores (2008) demonstram que tanto o extrato aquoso quanto o extrato etanólico da *Achillea millefolium* apresentaram atividade anti-helmíntica em ruminantes infectados com diferentes tipos de nematóides. Frações da *Achillea millefolium* também apresentaram atividade antiinflamatória *in vitro*, inibindo de maneira dependente da dose a serina-protease elastase de neutrófilo humano, substância envolvida no processo inflamatório, principalmente na inflamação crônica (BENEDEK, 2007).

Recentemente, PIRES e colaboradores (2009) demonstraram que o extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* apresentou efeito anti-nociceptivo em camundongos. Esse efeito parece ser devido à presença de altas concentrações de substâncias como: rutina, ácido hidroxibenzóico e ácido caféico.

Em outro estudo, usando a fração flavonóide da *Achillea millefolium*, foi observado redução, de maneira dependente da dose, da força de contração do íleo isolado de cobaias, comprovando a atividade espasmolítica da “mil-folhas” (BENEDEK 2007).

Estudos realizados em nosso laboratório de pesquisa mostraram que o extrato aquoso desta planta possui um potente efeito anti-secretório e atividade gastroprotetora em diversos modelos agudos de lesão gástrica (BAGGIO *et al.*, 2002), bem como no modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético. Além disso, a administração

crônica do extrato é desprovida de efeitos tóxicos relevantes (CAVALCANTI, *et al.*, 2006).

### ***1.2 Anatomia e fisiologia do trato gastrointestinal (TGI)***

O sistema digestório é basicamente um tubo muscular com epitélio especializado que compreende a cavidade bucal, faringe, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso, e ânus. Além disso, existem os órgãos anexos, tais como: glândulas salivares, fígado e pâncreas, os quais secretam substâncias que auxiliam no processo digestivo dos alimentos. O TGI, juntamente com os órgãos anexos, tem a função de receber, digerir, absorver e eliminar substâncias ingeridas, e todos esses processos são controlados pelo sistema nervoso e pelo sistema hormonal (MERCHANT, 2007; GUYTON e HALL, 1997).

O TGI possui um sistema nervoso próprio, denominado Sistema Nervoso Entérico (SNE), que contém cerca de 100 milhões de neurônios, número esse, que aproxima-se àquele existente na medula espinhal. O SNE começa no esôfago e estende-se ao ânus, controlando os movimentos e as secreções gastrintestinais. É formado pelo plexo mioentérico ou plexo de Auerbach (plexo externo situado entre as camadas musculares longitudinal e circular) e pelo plexo de Meissner ou submucoso (plexo interno localizado na submucosa), constituindo a inervação intrínseca do órgão (GUYTON e HALL, 1997; PASRICHA, 2006; RANG *et al.*, 2004). O plexo mioentérico é responsável pelo controle motor (peristaltismo) e o plexo submucoso é responsável pela regulação da secreção, do transporte de líquidos e pelo fluxo sanguíneo (PASRICHA, 2006). Células nervosas de ambos os plexos recebem estímulos do sistema nervoso central, através de fibras do sistema nervoso simpático e



parassimpático (inervação extrínseca), e de outros neurônios entéricos (incluindo neurônios sensoriais e interneurônios). Essa comunicação neuronal existente permite a realização das funções motoras e secretoras do TGI (GUYTON e HALL, 1997; PASRICHA, 2006).

A maior parte das fibras nervosas extrínsecas inerva o estômago via nervo vago. As fibras vagais *eferentes* são fibras pré-ganglionares parassimpáticas, e o alvo dessas fibras é o gânglio mioentérico, pelo qual o controle central da motilidade e secreção gástrica são regulados (GERSHON, *et al.*, 1994). As fibras vagais *aférentes* são fibras pós-ganglionares simpáticas que possuem extensas projeções para a mucosa gástrica e artérias, e são de particular interesse na proteção da mucosa gástrica (HOLZER, 1998).

O estômago, órgão de interesse desse estudo, é dividido anatomicamente em fundo, corpo e antro. O fundo está situado na região superior e tangencia a junção esofagogástrica; o corpo corresponde à maior parte do órgão; e o antro está situado na região proximal ao canal pilórico (DANGELO e FATTINI, 2007).

A parede do estômago apresenta várias camadas teciduais, compreendendo a serosa, a camada muscular longitudinal, a camada muscular circular, a submucosa e a mucosa. A serosa é a camada tecidual que reveste a maior parte do órgão, exceto em uma pequena porção da parte posterior do estômago (região do cárdia); a submucosa é constituída de tecido conjuntivo frouxo e contém uma rica rede vascular e um plexo nervoso - conhecido como plexo submucoso; e a mucosa é a camada da parte interna do estômago que abriga numerosas glândulas gástricas (DANGELO e FATTINI, 2007).

Existem vários tipos de glândulas no trato gastrointestinal. Entretanto, no estômago podem ser citadas as glândulas oxínticas e as glândulas pilóricas, que secretam diversas substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do estômago. As glândulas oxínticas estão localizadas na superfície interna do corpo e

fundo do estômago, e são compostas por células mucosas (que secretam o muco), células pépticas ou principais (responsáveis pela secreção do pepsinogênio, o qual, quando em contato com o ácido clorídrico, é convertido em pepsina atuando como enzima proteolítica), células parietais (que secretam o ácido clorídrico), células D (que secretam somatostatina) e células enterocromoafins (ECL) (que secretam histamina). As glândulas pilóricas estão localizadas na porção antral do estômago e possuem células mucosas (produtoras de muco), células G (que quando estimuladas liberam o hormônio gastrina, que tem papel importante na secreção ácida gástrica) e também células D (SCHUBERT e PEURA, 2008). Além disso, a superfície estomacal é recoberta por células mucosas superficiais que são especializadas em secretar grandes quantidades de um muco extremamente viscoso e alcalino. Esse muco cobre toda a parede do estômago, chegando a ter mais de um milímetro de espessura, proporcionando uma barreira física de proteção contra as secreções ácidas que são produzidas pelas células parietais, além de contribuir para a lubrificação do transporte do alimento (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Todas essas estruturas gástricas citadas são responsáveis por desempenhar funções específicas que promoverão a manutenção da homeostasia do órgão, como a secreção de ácido clorídrico, pepsinogênio, muco, bicarbonato e prostaglandinas (PGs). Além disso, outras substâncias como o óxido nítrico (NO) e enzimas antioxidantes (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutathione peroxidase - GPx) e glutathione reduzida (GSH) também estão relacionadas com a manutenção da integridade gástrica.

### ***1.3 Regulação fisiológica da secreção ácida gástrica***

A secreção do ácido clorídrico gástrico ocorre na célula parietal através da  $H^+K^+$  - adenosina trifosfatase ( $H^+K^+/ATPase$  – bomba de prótons). O ácido gástrico facilita a digestão de proteínas e absorção de ferro, cálcio e vitamina B-12, além de prevenir o desenvolvimento bacteriano e outras infecções entéricas (SCHUBERT e PEURA, 2008). A  $H^+K^+/ATPase$  consiste de duas subunidades, a subunidade  $\alpha$  (a qual contém o sítio catalítico da enzima, responsável pela troca iônica do  $H^+$  intracelular pelo  $K^+$  luminal), e a subunidade  $\beta$  (responsável pela estabilidade estrutural e funcional da enzima, protegendo a enzima de possível degradação) (SCHUBERT e PEURA, 2008; SCHUBERT, 2005). A troca iônica ( $H^+K^+$ ) promovida pela bomba de prótons é acompanhada pela extrusão de íons cloro, da célula parietal, via canais de cloro localizados na membrana apical da célula parietal. Os íons de  $H^+$  e  $Cl^-$  ligam-se formando o ácido clorídrico, que atingirá o lúmen gástrico (SCHUBERT e PEURA, 2008).

Em estado não-estimulado, a célula parietal contém abundantes vesículas tubulares intracelulares que estocam a  $H^+K^+/ATPase$ . Quando ocorre o estímulo (elevação da concentração de cálcio intracelular, AMPc, ou ambos), uma cascata de eventos intracelulares desencadeia a fusão das vesículas tubulares na membrana apical da célula parietal, promovendo ativação da bomba de prótons, iniciando, com isso, o processo de secreção do ácido gástrico. Quando o estímulo encerra-se, as bombas são recicladas e retornam ao compartimento vesicular intracelular (para revisão ver SCHUBERT, 2005).

A secreção de ácido gástrico é regulada pela via neuronal, parácrina e endócrina (KONTUREK, *et al.*, 2004). Neurônios aferentes e eferentes providenciam uma comunicação bidirecional entre o SNC e o estômago além de uma grande variedade de

neuropeptídeos, que agem centralmente e periféricamente para regular a secreção ácida gástrica (para revisão ver SCHUBERT, 2005).

A célula parietal está localizada na mucosa oxíntica e tem como função secretar ácido clorídrico no estômago. Os principais estimulantes da secreção do ácido são a acetilcolina (ACh), liberada de neurônios pós-ganglionares entéricos; a gastrina, liberada de células G do antro gástrico; e a histamina, liberada das ECL. O principal inibidor da secreção do ácido gástrico é a somatostatina liberada das células D da mucosa oxíntica e pilórica.

Na via neuronal, o Sistema Nervoso Central (SNC) modula a atividade do SNE através da acetilcolina, estimulando a secreção de ácido gástrico em resposta à antecipação ao alimento (odor, visão, salivação), o que caracteriza a “fase cefálica” da secreção ácida gástrica. As fibras eferentes que se originam nos núcleos motores dorsais, descem até o estômago pelo nervo vago e fazem sinapse com células ganglionares do SNE. A ACh é liberada pelos neurônios pós-ganglionares do nervo vago e estimula diretamente a secreção do ácido por atuar em receptores muscarínicos  $M_3$  localizados na membrana basolateral da célula parietal. Além disso, há um estímulo indireto à liberação de histamina pelas ECL, bem como à liberação de gastrina pelas células G na região do antro (para revisão ver SCHUBERT, 2005).

A secreção de ácido gástrico também é regulada por mediadores, tais como: histamina, gastrina e somatostatina.

A histamina é estocada principalmente em células ECL que comumente se localizam em estreita proximidade com as células parietais. Quando a histamina é liberada, ela estimula a secreção do ácido gástrico diretamente pela ligação em receptores  $H_2$  na célula parietal, desencadeando uma cascata de eventos intracelulares, resultando, com isso, no aumento dos níveis de AMPc e ativação da PKA. A ativação

da via dependente de AMPc estimula a bomba de prótons na célula parietal,, resultando na secreção de ácido (JAIN, *et al.*, 2007). Além disso, a histamina modula a secreção do ácido de maneira indireta, por atuar em receptores  $H_3$  na célula D do antro gástrico, inibindo a secreção de somatostatina (substância que tem função de inibir a secreção do ácido por suprimir a liberação de gastrina, mediante retroalimentação negativa); e atuar nas células G estimulando a liberação de gastrina (VOYYURU, *et al.*, 1995; ROULEAU, *et al.*, 2004).

A gastrina é produzida pela célula G do antro gástrico, mas também pode ser produzida em pequenas quantidades no intestino delgado, cólon e pâncreas. Este hormônio é o principal mediador da secreção ácida estimulada pela alimentação e age principalmente liberando histamina das células ECL no corpo e fundo do estômago. Quando liberada da célula G, liga-se em receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2 (CCK-2) localizados na célula parietal, promovendo aumento dos níveis de cálcio intracelular, o qual estimulará a bomba de prótons ( $H^+/K^+$ -ATPase), desencadeando a formação de ácido. Esses receptores estão presentes nas células ECL, aos quais a gastrina pode ligar-se promovendo a liberação de histamina (ALY, *et al.*, 2004; BEALES, 2004).

Por outro lado, a somatostatina sintetizada a partir da molécula precursora preprosomatostatina, presente nas células D da glândula oxíntica e pilórica, inibem a secreção ácida por agir diretamente na célula parietal; e indiretamente por inibir a secreção de histamina e gastrina. Quando ocorre redução excessiva do pH do lúmen gástrico, a secreção de somatostatina é estimulada, que por outro lado, atenua a liberação de histamina, gastrina e consequentemente a formação de ácido (para revisão ver SCHUBERT, 2005).

A secreção do ácido gástrico é extremamente importante, visto que é responsável pelo processo digestivo (para a formação do bolo alimentar denominado quimo, que será absorvido posteriormente no intestino delgado) e por promover a proteção do organismo contra possível contaminação bacteriana. Além disso, a regulação fisiológica da secreção ácida gástrica é a principal terapia no tratamento de distúrbios gástricos. Porém existem diversos mecanismos pelo qual o organismo promove a proteção e mantém a integridade da mucosa gástrica.

#### ***1.4 Fatores envolvidos na integridade da mucosa gástrica***

A barreira muco-bicarbonato é a primeira linha de defesa da mucosa gástrica. Esta barreira é formada pelo gel mucoso, bicarbonato e fosfolipídios surfactantes, os quais cobrem a superfície da mucosa. Esta camada retém o bicarbonato secretado pelas células superficiais epiteliais para que o microambiente permaneça neutro, prevenindo a penetração da pepsina e a digestão proteolítica da superfície epitelial (LAINE *et al.*, 2008).

O muco é secretado em todo o trato gastrointestinal desde o estômago até o cólon, formando um gel aderente entre a mucosa e o lúmen, protegendo a mucosa contra agentes nocivos. É secretado pelas células epiteliais da mucosa e contém 95% de água e 5% de mucina (glicoproteína). A secreção de muco é estimulada por hormônios gastrointestinais, como gastrina e secretina, bem como por prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) e agentes colinérgicos. Substâncias ulcerogênicas, como antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e sais de bile, causam dissipação do gel mucoso e da camada de fosfolipídios, causando a lesão da mucosa (LAINE *et al.*, 2008).

O bicarbonato ajuda a manter uma zona de pH neutro na mucosa oferecendo uma barreira protetora contra a difusão do ácido. Sabe-se que a PGE<sub>2</sub> estimula a secreção de bicarbonato no estômago, via ativação dos receptores EP<sub>1</sub>; e no duodeno, via ativação de receptores EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub> em ratos (AOI, *et al.*, 2004; NAKASHIMA, *et al.*, 2004). Além disso, o fator liberador de corticotrofina, a melatonina, a uroguanilina e a orexina A, também estimulam a secreção de bicarbonato (LAINE *et al.*, 2008). Muitos investigadores relatam que a acidificação desses tecidos, por si só, provocam a secreção de bicarbonato com concomitante aumento dos níveis de PGE<sub>2</sub> (SUGAMOTO, *et al.*, 2001; KAGAWA, *et al.*, 2003; NAKASHIMA *et al.*, 2004).

A barreira muco-bicarbonato é somente uma barreira pré-epitelial entre o lúmen e o epitélio. Quando essa barreira é quebrada, a próxima etapa do mecanismo protetor inclui a neutralização do ácido intracelular, reparação epitelial rápida, bem como manutenção e distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa (LAINE, *et al.*, 2008). Um importante agente nesta etapa são as PGs, que desempenham uma série de eventos que promovem a proteção da mucosa gástrica.

As PGs são derivadas de ácidos graxos de 20-carbonos e são encontradas em praticamente todos os tecidos e órgãos, desempenhando uma grande variedade de funções fisiológicas e patológicas. Elas são sintetizadas a partir de diferentes precursores, sendo um deles, o ácido araquidônico (AA), que é convertido a endoperóxidos instáveis, PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub> pela ação da ciclooxygenase (COX). Três isoformas de COX foram descritas: COX-1 expressa constitutivamente; COX-2 induzível (SMITH, *et al.*, 1996); e COX-3, uma variante da COX-1 (CHANDRASEKHARAN, *et al.*, 2002). As PGs derivadas do AA são denominadas PGs da série-2, incluindo a PGE<sub>2</sub> e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que são extremamente importantes no trato gastrointestinal (CALDER, 2001). Isomerases e sintases efetuam a

transformação da  $\text{PGH}_2$  em prostanóides terminais, como  $\text{PGI}_2$  e  $\text{PGE}_2$ . Como já citado anteriormente, uma vez liberados, esses prostanóides exercem suas funções biológicas pela interação com receptores específicos na superfície celular (NARUMIYA, 1994).

A geração contínua de  $\text{PGE}_2$  e  $\text{PGI}_2$  é crucial para a manutenção da integridade da mucosa, além de proteger contra agentes ulcerogênicos e necrotizantes. As PGs inibem a secreção de ácido; estimulam a secreção de muco, bicarbonato e fosfolipídios; aumentam o fluxo sanguíneo da mucosa; e aceleram a restituição epitelial e cicatrização da mucosa. Além disso, inibem a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas no endotélio vascular (LAINE, *et al.*, 2008). A diversidade de funções desempenhadas pelas PGs é decorrente de sua ligação com quatro diferentes tipos de receptores, denominados  $\text{EP}_1$ ,  $\text{EP}_2$ ,  $\text{EP}_3$  e  $\text{EP}_4$ . A  $\text{PGE}_2$ , segundo DING, e colaboradores (1997), tem uma ação dual na secreção ácida gástrica, sendo que, em baixas concentrações, inibe a secreção e, em altas concentrações, estimula a secreção ácida gástrica. A ação inibitória e estimulatória seriam promovidas pela ativação de receptores  $\text{EP}_3$  e  $\text{EP}_4$ , respectivamente. Além disso, a  $\text{PGE}_2$  tem efeito estimulatório sobre a secreção de bicarbonato no estômago via receptores  $\text{EP}_1$ , enquanto no duodeno, tal ação ocorre via receptores  $\text{EP}_3$  (TAKEUCHI, *et al.*, 1999), destacando-se, ainda, como um potente secretagogo de mucina em células epiteliais gástricas de ratos (TANI, *et al.*, 1997).

Outro agente importante na proteção e manutenção da integridade gástrica é o óxido nítrico (NO). Esse gás volátil é formado a partir da L-arginina, cuja reação de oxidação é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Existem três diferentes isoformas de NOS, das quais, duas são constitutivamente expressas (óxido nítrico sintase neuronal - nNOS ou NOS-1; e óxido nítrico sintase endotelial - eNOS ou NOS-3), e uma terceira que é induzida (óxido nítrico sintase induzida - iNOS ou NOS-2).



Quando gerado, o NO liga-se ao grupo heme da guanilil ciclase solúvel (GCs), que catalisa a conversão de GTP para GMPc, aumentando, por conseguinte, a concentração de GMPc intracelular. Por sua vez, esse segundo mensageiro liga-se aos domínios específicos de moléculas efetoras, incluindo proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases, desencadeando as subsequentes respostas celulares. No trato gastrointestinal, as isoformas constitutivas são expressas a níveis basais no SNE, bem como nas células endoteliais vasculares. A isoforma induzida é expressa em macrófagos e neutrófilos, além de ser observada em células epiteliais e neurônios. A iNOS é uma enzima cálcio-independente que é ativada e expressa em resposta à inflamação e/ou outros estímulos, gerando uma grande quantidade de NO. No trato gastrointestinal, o NO atua na manutenção da homeostase, sendo responsável por múltiplas funções fisiológicas, bem como na integridade do epitélio gástrico e da barreira de muco. Além disso, atua como vasodilatador e, portanto, regula o fluxo sanguíneo gástrico. Experimentos em ratos revelam que o inibidor não seletivo de NOS, N<sup>G</sup>-monometil L-arginina (L-NMMA), induz um aumento dependente da dose na pressão arterial sistêmica e uma diminuição no fluxo sanguíneo da mucosa gástrica. Outros trabalhos demonstram que os doadores de NO promovem aumento da camada de muco em ratos e, estudos mais recentes, têm demonstrado que NO também protege o trato gastrointestinal ao inibir a secreção de ácido gástrico. A aplicação intra-gástrica de doadores de NO, como o FK409 e o nitroprussiato de sódio, não apenas diminuem a secreção gástrica basal, como também a secreção estimulada pela pentagastrina. Provavelmente, essa ação ocorra de forma dependente de GMPc (para revisão ver LANAS, 2008).

### ***1.5 Espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) e enzimas antioxidantes***

Um radical livre é definido como qualquer espécie química que contém um ou mais elétrons desemparelhados. Espécies reativas derivadas de oxigênio (ROS) é uma expressão que inclui radicais de oxigênio, como radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), hidroxila ( $OH^{\bullet}$ ), peroxila ( $RO_2$ ) e hidroperoxila ( $HO_2$ ) e outros agentes oxidantes que não são radicais, como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) e ozônio ( $O_3$ ), porém podem ser convertidos fácil e rapidamente em radicais (HALLIWELL e GUTRIDGE, 1989).

As espécies reativas derivadas de oxigênio (EROs) são produzidas como produto do metabolismo celular normal e podem induzir dano e, eventualmente, a morte celular.

Em geral, o ambiente redox (oxidação-redução) do interior das células impede os danos causados pelos radicais livres. Este ambiente redox é mantido pela ação de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione (GSH). Alterações no estado redox e depleção de antioxidantes pela exposição a agentes oxidantes levam ao estresse oxidativo e dano oxidativo (BAYIR, 2005).

A SOD é uma metaloproteína que dismuta o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ). Existem três tipos de SOD: CuZn-SOD, Mn-SOD e Fe-SOD. A CuZn-SOD é encontrada no citosol de células eucarióticas, em cloroplastos e algumas espécies de bactérias; a Mn-SOD é encontrada na mitocôndria de eucarióticos e procarióticos e a Fe-SOD em procarióticos. As mitocôndrias são muito susceptíveis aos danos causados pelas ROS, os quais são gerados continuamente na cadeia respiratória, e é por essa razão que existe uma enzima antioxidante nesta organela (RAHA e ROBINSON, 2000). Existe também uma forma extracelular de CuZn-SOD ( $SOD_{ex}$ ), que difere estruturalmente da forma citosólica, e é

encontrada principalmente na matriz e no fluido extracelular dos tecidos (OURY, et al., 1996). A formação do radical superóxido acontece espontaneamente na membrana mitocondrial, mas pode ser produzido também endogenamente, por flavoenzimas, como xantina oxidase ativada na isquemia de reperfusão, lipoxigenase, ciclooxygenase e NADPH oxidase também o produzem (NORDBERG, ARNER, 2001).

O peróxido de hidrogênio não é considerado um radical livre, mas é altamente importante pela sua habilidade de penetrar nas membranas biológicas, e por ser intermediário na formação de moléculas mais reativas, tais como o ácido hipocloroso (HOCl) pela ação da mieloperoxidase (enzima presente nos fagossomas de neutrófilos), e mais importante na formação de  $\bullet\text{OH}$  via ativação de metais de transição. O peróxido de hidrogênio é removido por três sistemas enzimáticos antioxidantes: catalase, glutathione peroxidase e peroxiredoxinas (NORDBERG e ARNER, 2001). A catalase localiza-se principalmente nos peroxissomos, onde catalisa a dismutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A catalase tem a função também de detoxificação de diferentes substratos, como fenóis e alcoóis pela redução do peróxido de hidrogênio. A catalase liga-se com NADPH, o qual protege a enzima da inativação e aumenta assim sua eficiência (KIRKMAN e GAETANI, 1984; KIRKMAN *et al.*, 1999).

A glutathione é um tripeptídeo e representa o mais proeminente tiol de baixo peso molecular presente nas células. Os níveis celulares de GSH são controlados por diversos sistemas enzimáticos  $\gamma$ -glutamyltranspeptidase ( $\gamma$ -GT), transportador de aminoácidos, glutathione sintase (GS), GPx e glutathione redutase (GR) (ISHIKAWA, *et al.*, 1997). Sobre condições de estresse oxidativo, as ROS são reduzidas pelo GSH com formação concomitante de GSSG (dissulfido oxidado). O GSH reage rapidamente e não enzimaticamente com o radical hidroxila, com  $\text{N}_2\text{O}_3$  e peroxinitrito (GRIFFITH, 1999),

indicando a sua ação antioxidante química. A glutathione age como um co-fator do GPx mediando a redução de peróxido resultando na formação de GSSG (CNUBBEN, *et al.*, 2001). Em condições normais o GSSG é reduzido para GSH pela glutathione redutase (GR) na presença de NADPH, formando o ciclo redox (LU, 2000). Em condições de estresse oxidativo, para manter o balanço redox, o GSSG é exportado da célula por proteínas transportadoras dependentes de ATP, implicando que em condições severas de estresse oxidativo ocorre a depleção dos níveis de GSH (LEIER, *et al.*, 1996).

Atualmente as EROs estão relacionadas com diversas condições fisiopatológicas, como o envelhecimento, a infertilidade, o câncer, além de doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (McCORD, 1993; ADAMS e ODUNZE, 1991; JACOB e BURRI, 1996; MULTHAUP *et al.*, 1997). Muitos estudos têm demonstrado que as EROs estão envolvidas em diversos modelos de lesão gástrica. No modelo de lesão gástrica induzida por AINEs, estudos demonstram que os níveis de GSH (ODABASOGLU, *et al.*, 2005; DEVI, *et al.*, 2007; MOTAWI, *et al.*, 2008) e SOD diminuem (ODABASOGLU, *et al.*, 2005; DEVI, *et al.*, 2007; MOTAWI, *et al.*, 2008; BILICI *et al.*, 2008), enquanto a atividade da CAT aumenta (ODABASOGLU, *et al.*, 2005; DENGIZ, *et al.*, 2007; BILICI *et al.*, 2008). Em estudo realizado por FERREIRA e colaboradores (2008), foi observado que o tratamento com um bloqueador dos grupos sulfidrílicos não protéicos é acompanhado por aumento das lesões gástricas induzidas por etanol. Outro estudo mostrou que os níveis de SOD foram reduzidos em animais submetidos à lesão gástrica induzida pelo etanol (INEU, *et al.*, 2008). Esses dados aumentam o interesse na investigação da atividade dessas enzimas em modelos de lesão gástrica e da descoberta de drogas que também possuam atividade sequestradora de radicais livres, além de outras atividades gastroprotetoras.

### 1.6 Úlcera péptica

A úlcera péptica é uma lesão caracterizada pela perda circunscrita de tecido que ultrapassa os limites da camada muscular da mucosa e ocorre nas porções expostas à secreção ácida. A úlcera pode desenvolver-se na porção inferior do esôfago, no estômago e no duodeno. A úlcera péptica gastroduodenal é uma doença heterogênea, com múltiplos fatores envolvidos na sua gênese, afetando aproximadamente 5 a 10% da população, representando uma das doenças crônicas mais comuns. Apesar dos grandes avanços no conhecimento da doença ulcerosa péptica, a sua etiopatogenia não é totalmente conhecida. Dentre as hipóteses mais aceitas como causa dessa patologia, são citados: fatores genéticos, fatores endógenos (distúrbios fisiopatológicos) e fatores exógenos (estresse, tabagismo, dieta alimentar, uso de antiinflamatórios não esteroidais e infecção por *Helicobacter pylori*) (CARVALHO, 2000). De fato, a mucosa gástrica é continuamente exposta a vários fatores e agentes nocivos, sejam eles endógenos (ácido clorídrico e pepsina) ou exógenos (*Helicobacter pylori*, fumo, ingestão de álcool, uso de AINEs, estresse). Em contra partida, o organismo possui potentes mecanismos de defesa (barreira muco-bicarbonato, fosfolipídios da superfície epitelial de revestimento, camada lipoproteica da membrana, fluxo sanguíneo, síntese de PGs, NO e sistema antioxidante) que protegem a mucosa de possíveis lesões.

Atualmente é bem conhecido que o uso de AINEs induz úlceras pépticas quando usados por períodos prolongados. O efeito sistêmico mais importante dos AINEs, em termos de induzir ulceração gástrica refere-se à sua habilidade de suprimir a síntese de PGs (WALLACE, 2008). De fato, vários estudos têm demonstrado que o uso de AINEs convencionais, ou inibidores seletivos de COX-2, provocam ulceração gastrointestinal tanto em animais experimentais quanto em humanos. A habilidade dos AINEs em

provocar ulceração gastrointestinal foi primeiramente demonstrada há mais de 60 anos atrás e, desde então, grande atenção tem sido dada a produção de antiinflamatórios que sejam desprovidos deste efeito adverso (WALLACE, 2001).

Outro fator de grande importância no desenvolvimento de úlceras gástricas é o consumo de álcool pela população, que pode produzir erosão gástrica aguda hemorrágica. A ingestão excessiva pode resultar em gastrite caracterizada por edema, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias na mucosa gástrica (JAHOVIC, *et al.*, 2007; MATSUHASHI, *et al.*, 2007). Além disso, em modelos experimentais o etanol tem efeito ulcerogênico e necrotizante que resulta em dano direto da mucosa. Em cultura de células, o etanol tem sido descrito como capaz de retardar a restauração do epitélio gástrico por provocar danos no “citoesqueleto” dessas células (MATSUHASHI, *et al.*, 2007). O etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos, inibição da síntese de PGs e consequente redução da produção de muco, além de provocar dano no endotélio vascular da mucosa gástrica, desordem da microcirculação e isquemia, resultando na produção de EROs (PAN, *et al.*, 2008).

O TGI tem a capacidade de produzir grandes quantidades de EROs pelos processos de oxidação na mucosa, dentre os quais podemos citar: xantina oxidase, amina oxidase, aldeído oxidase bem como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida oxidase (NADPH oxidase) encontrada em leucócitos residentes (macrófagos, neutrófilos e eosinófilos). Quando ocorre o desequilíbrio entre os fatores irritantes e os mecanismos protetores, o resultado é o desenvolvimento de inflamação aguda que é acompanhada pela infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica, os quais são recrutados por citocinas pró-inflamatórias, gerando, com isso grandes quantidades de EROs pela ativação da NADPH oxidase. (DONG e KAUNITZ, 2006; FIALKOW, *et al.*, 2007). O

dano gastrointestinal provocado por AINEs, etanol, isquemia/reperfusão, *H. pylori* e estresse, pode estar relacionado ao mecanismo de produção de EROs (DONG e KAUNITZ, 2006).

Portanto, a integridade da mucosa gastrointestinal depende de um equilíbrio entre os fatores agressivos e os fatores protetores, sendo que a úlcera é o resultado final de uma série de alterações fisiológicas.

### ***1.7 Cicatrização da úlcera***

Por definição, a úlcera gástrica é uma lesão que atinge a mucosa, submucosa e, algumas vezes, a muscular externa. Histologicamente caracteriza-se por duas grandes estruturas: a margem da úlcera (formada por tecido adjacente não-necrosado da mucosa, denominado componente epitelial) e o tecido de granulação na base da úlcera (denominado componente tecidual conectivo), formado por fibroblastos e macrófagos, sendo esse, o local em que ocorre a proliferação de células endoteliais e formação de microvasos (TARNAWSKI, 2005).

A cicatrização da úlcera é um processo complexo que envolve migração e proliferação celular, re-epitelização, angiogênese e deposição da matriz celular (TARNAWSKI, 2005; WALLACE, 2001), sendo controlados por fatores de crescimento, fatores de transcrição e citocinas (TARNAWSKI, 2005).

Os maiores fatores que estimulam a proliferação, divisão e migração celular, bem como a re-epitelização são os fatores de crescimento. Inicialmente esses fatores de crescimento são produzidos localmente devido à própria ulceração, ou seja, linhagens de células da mucosa começam a expressar genes que produzirão fatores de crescimento endotelial, de fibroblastos básicos e endotelial vascular, entre outros. Tais fatores, uma

vez produzidos no local, ativarão a migração e proliferação de células epiteliais através de ações autócrinas e/ou parácrinas (TARNAWSKI, 2005).

Todos esses processos ocorrem com apenas um intuito: restabelecer a integridade física da mucosa gástrica e a cicatrização pela consequente re-epitelização. Esse processo é fundamental, visto que, o epitélio é uma barreira contínua de tecido de granulação responsável pela proteção da mucosa contra agentes irritantes químicos e infecções.

### ***1.8 Farmacoterapêutica da úlcera péptica***

Por mais de um século as úlceras pépticas eram controladas cirurgicamente, resultando em altas taxas de morbidade e mortalidade. Como estratégia de tratamento, o entendimento sobre a fisiopatologia dessas lesões é focado nas anormalidades da secreção de ácido gástrico e de pepsina, bem como na supressão dessa atividade secretória ácida. Em meados da década de 70, a supressão farmacológica da secreção ácida gástrica foi efetivada com a introdução dos antagonistas de receptores  $H_2$  histaminérgicos (cimetidina e ranitidina) e, até 1990, foram os fármacos mais prescritos no mundo inteiro. Atualmente, existem quatro antagonistas  $H_2$  utilizados clinicamente: cimetidina, ranitidina, famotidina e nizatidina, os quais promovem a redução da secreção do ácido ao competir reversivelmente com a histamina pela sua ligação aos receptores  $H_2$  nas células parietais, diminuindo os níveis de AMPc. Mais tarde, com o desenvolvimento dos inibidores da bomba de prótons  $H^+/K^+ATPase$  (IBP), houve uma acentuada redução no uso dos antagonistas de receptores  $H_2$  histaminérgicos. Os IBP (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol) são medicamentos extremamente eficazes na inibição da secreção do ácido gástrico, resultando em melhoras significativas nas taxas de cicatrização de úlceras gástricas e duodenais. Além



disso, atualmente são os medicamentos mais utilizados no tratamento e prevenção dos distúrbios ácido-pépticos. Porém, tanto os antagonistas de receptores  $H_2$  quanto os IBPs, podem apresentar alguns efeitos adversos quando utilizados cronicamente devido à supressão do ácido gástrico. Dentre esses efeitos, destacam-se o desenvolvimento da hipergastrinemia (resultante da menor liberação de somatostatina a partir das células D, que ocorre subsequentemente à supressão da secreção ácida) e o aumento do risco de infecção bacteriana (como pela *Helicobacter pylori*), ressaltando-se que esses dois problemas podem levar à formação de câncer gástrico (YUAN, *et al.*, 2006; BRUNTON, *et al.*, 2006).

Diante dos efeitos colaterais provocados pela utilização crônica desses fármacos, se faz necessário investigar alternativas que agreguem efeitos farmacológicos capazes de promover a prevenção e a cicatrização de úlceras, com ausência ou redução de efeitos colaterais.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 *Objetivo geral*

- Determinar a atividade e possíveis mecanismos gastroprotetores do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L. (EBHA) no modelo de úlcera aguda induzida por etanol P.A. e úlcera crônica induzida por Ácido acético a 80% em ratos.

### 2.2 *Objetivos específicos*

- Verificar a atividade gastroprotetora do EBHA em modelos de lesão gástrica induzida por etanol e ácido acético.
- Avaliar a cicatrização por cortes histológicos em estômagos submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético;
- Avaliar a atividade antioxidante do EBHA pelo sequestro do radical livre 2,2-difenil 1- picrilhidrazil (DPPH);
- Quantificar o conteúdo de glutathione (GSH) e avaliar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) em estômagos submetidos à lesão aguda induzida por etanol P.A e crônica induzida por ácido acético 80%;
- Analisar a atividade da mieloperoxidase (MPO) em estômagos submetidos à lesão crônica induzida por ácido acético.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### ***3.1 Coleta e identificação do material botânico***

A espécie *Achillea millefolium* utilizada em nossos experimentos foi fornecida pelo Horto de Plantas Medicinais da Universidade Paranaense (UNIPAR), campus Umuarama (Brasil). Essa espécie foi selecionada e identificada pela Profa. Dra. Mariza Barion Romagnolo do Departamento de Botânica da UNIPAR. As partes aéreas isentas de inflorescências, foram coletadas em julho de 2007 no período vespertino, e um exemplar da espécie foi depositado no herbário desta Universidade sob número 1896. O material vegetal coletado foi seco em estufa com circulação forçada de ar à 37 °C por cinco dias. Após a secagem, o material foi submetido à trituração. A pulverização foi realizada em trituradores industriais, e em seguida, o material foi acondicionado em sacos duplos, de polietileno na parte interna e de papel kraft na parte externa, até o preparo dos extratos brutos.

#### ***3.2 Métodos fitoquímicos***

##### ***3.2.1 Obtenção do extrato bruto hidroalcoólico (EBHA)***

O extrato bruto hidroalcoólico (EBHA) (etanol/água 9:1), obtido a partir de álcool 90%, foi preparado na proporção de 100 g de vegetal pulverizado para cada 100 ml de solvente. A extração foi realizada por maceração à temperatura ambiente, inicialmente por 48 horas e posteriormente até esgotamento do macerado. O EBHA obtido foi filtrado e concentrado à pressão reduzida em evaporador rotatório, com temperatura entre 50-55 °C. Após a eliminação do solvente orgânico, o extrato concentrado foi congelado em nitrogênio líquido, liofilizado e então conservado em

freezer -20°C até o momento do uso. Para a utilização, os extratos foram dissolvidos em água.

### **3.3 Animais**

Foram utilizadas ratas, variedade Wistar, pesando entre 180 – 220 g, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, onde foram mantidas em condição claro/escuro de 12 horas, com acesso a ração e água *ad libitum*. Os animais permaneceram em jejum sólido 12-16 horas antes dos experimentos. Os protocolos experimentais foram submetidos ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Paraná, e aprovado sob o número 161.

### **3.4 Métodos farmacológicos “in vivo”**

#### **3.4.1 Indução de lesão gástrica aguda induzida pelo etanol em ratas**

No modelo de lesão gástrica induzida por etanol (ROBERT, *et al.*, 1979), ratas Wistar (n=8) foram pré - tratadas com: veículo (água 0,1 ml/100g de peso corporal), omeprazol (40 mg/kg, v.o.), ácido ascórbico (500 mg/kg, v.o.) e EBHA nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o.), 1 h antes da administração do etanol P.A. (0,5 ml, v.o.). Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical após anestesia profunda com cetamina e xilazina (60 mg/kg e 7,5 mg/kg ip, respectivamente) 1 hora após a indução da lesão por etanol. Os estômagos foram removidos e a extensão da lesão gástrica foi mensurada com auxílio do programa Image Tool 3.0.

### 3.4.2 Indução de lesão gástrica crônica pelo ácido acético em ratos

Ratas Wistar (n=10) foram submetidas a processo cirúrgico para indução de úlcera gástrica, utilizando como agente indutor o ácido acético 80%. Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (60 mg/kg e 7,5 mg/kg i.p., respectivamente), a cavidade abdominal foi aberta (aproximadamente 2 cm de incisão) com auxílio de material cirúrgico e o estômago foi exposto. Para indução da úlcera foi utilizado um tubo de vidro de 8 mm de diâmetro e 2 cm de altura, em contato com a serosa do estômago para delimitar a área que seria lesada. Dentro do tubo foram adicionados 500 µl de ácido acético 80%, o qual permaneceu em contato com a serosa do estômago por 1 minuto. Após, o ácido acético foi removido com a ajuda de uma pipeta automática e o local foi lavado com solução salina (OKABE, *et al.*, 1971). O estômago foi acomodado na cavidade abdominal e a região abdominal foi suturada. Após a realização do processo cirúrgico os animais foram mantidos em dieta sólida durante o período de tratamento, os quais foram alimentados duas vezes ao dia durante uma hora.

No segundo dia após a indução da úlcera, iniciou-se o tratamento com: veículo (água, v.o.), omeprazol (40 mg/kg v.o.), ácido ascórbico (250 mg/kg v.o.) e as doses do extrato da *Achillea millefolium* (0,1, 1 e 10 mg/kg v.o.) durante 7 dias, duas vezes ao dia. Após o tratamento crônico, os animais foram sacrificados, o estômago retirado, aberto pela curvatura menor, lavado com água destilada e esticado para fazer a mensuração da área ulcerada (com auxílio de régua milimetrada). A mensuração da área lesada (mm<sup>3</sup>) foi realizada através da medida do comprimento x altura x profundidade da úlcera.

### **3.5 Métodos farmacológicos “in vitro”**

#### **3.5.1 Preparação das amostras para as análises enzimáticas e não enzimáticas**

Para a realização das análises enzimáticas e não-enzimáticas, a área das amostras lesadas foi coletada e pesada. As amostras foram homogeneizadas em tampão fosfato de potássio (200 mM, pH = 6,5), uma alíquota de 50 µl do homogenato resultante foi retirada para a realização da quantificação do conteúdo de glutathione (GSH), e o homogenato restante foi centrifugado a 9700 rpm por 20 minutos. O sobrenadante resultante foi usado para a determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). O pellet resultante foi usado para determinação da atividade mieloperoxidase (MPO) em estômagos ulcerados pelo ácido acético.

#### **3.5.2 Estudo “in vitro” da atividade do EBHA como sequestrador do radical livre 2,2-difenil 1-picrilhidrazil (DPPH)**

O DPPH é um radical livre estável, que, quando na sua forma oxidada, em solução metanólica produz coloração que pode ser mensurada a uma absorbância máxima de 520 nm (MARXEN, *et al.*, 2007). Esse radical quando em contato com substâncias doadoras de hidrogênio, passa a apresentar-se na sua forma reduzida, que é menos reativa. Esse processo de redução faz com que ocorra perda da coloração da solução contendo DPPH e consequente redução da absorbância (MOLYNEUX, 2004). A reatividade do extrato da *Achillea millefolium* com o radical livre DPPH foi determinada de acordo com o método descrito por BLOIS (1958) e CHEN *et al.* (2004), com pequenas modificações. A reação foi feita com 750 µl de EBHA (3, 10, 30 e 300 µg/ml), ácido ascórbico (50 µg/ml) ou água destilada e adição de 250 µl de solução

metanólica de DPPH (1 mg em 25 ml). Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, o decréscimo da absorbância foi lida a 517 nm.

### ***3.5.3 Quantificação do conteúdo de GSH na região glandular do estômago***

Estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético 80% ou etanol P.A. foram utilizados para verificar o efeito do extrato bruto da *Achillea millefolium* sobre os níveis de GSH na mucosa gástrica através de uma curva padrão de glutationa. Os níveis de dos grupos sulfidrílicos não protéicos na mucosa gástrica foram determinados através do método de SEDLAK e LINDSAY (1988). A parte glandular da mucosa gástrica lesada foi pesada e adicionado solução tampão fosfato de potássio 200 mM (pH 6,5), no qual foi preparado o homogenato. Os procedimentos foram realizados a 4°C, e os valores individuais interpolados numa curva padrão de GSH e expressos em µg GSH/g tecido.

Em 50 µl deste homogenato foi adicionado 40 µl de ácido tricloroacético (ATC) 12%, agitados por dez minutos em Vortex e centrifugados por quinze minutos a 3000 rpm. Alíquotas de 10 µl do sobrenadante juntamente com 290 µl de tampão TRIS-HCl 0,4 M (pH 8,9) foram depositadas em microplacas de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 5 µl de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) a 0,01 M, (um reagente que quando em contato com o grupo SH – tiol dos grupos sulfidrílicos, produz coloração amarela) cinco minutos antes da leitura espectrofotométrica (415 nm).

### ***3.5.4 Quantificação da atividade da SOD na região glandular do estômago***

Estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida por etanol P.A. ou ácido acético a 80% foram utilizados para verificar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na proteção da mucosa pelo EBHA. O método para determinar a

atividade da SOD foi baseado no método de MARKLUND, *et al.* (1974) e GAO, *et al.* (1998), o qual baseia-se na capacidade da SOD em inibir a auto-oxidação do pirogalol. As reações foram realizadas em Tampão Tris-HCl 200 mM com 2 mM de EDTA em pH 8,5 a temperatura ambiente. Os resultados foram expressos como unidade (U) de SOD/g tecido, sendo que 1 unidade de SOD corresponde a 50% de inibição da auto-oxidação do pirogalol.

Em eppendorfs foram adicionados 442,5 µl de Tris-HCl 200 mM com EDTA 2 mM e 20 µl do sobrenadante das amostras, os quais foram agitados em Vortex. Após, foram adicionados 25 µl de pirogalol (1 mM), e incubado por 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com a adição de 12,5 µl de HCl 1 N, e os eppendorfs foram centrifugados por 4 minutos a 14000 rpm. Em microplaca foram colocados 300 µl do sobrenadante para leitura em espectrofotômetro a 405 nm.

### **3.5.5 Quantificação da atividade da CAT na região glandular do estômago.**

Estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida pelo etanol P.A. ou ácido acético 80%, foram utilizados para verificar a atividade da enzima catalase (CAT) na proteção da mucosa pelo EBHA. A determinação da atividade da catalase (CAT) na região glandular do estômago foi baseada no método descrito por AEBI, *et al.*, 1984. Em uma cubeta de quartzo, 10 µl da solução reação foi diluída em 990 µl de: Tris/EDTA 5mM, pH = 8,0 (2,5 ml) + peróxido de hidrogênio a 30% (172,5 µl) + água miliQ (47,35 ml). A absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 240 nm e os resultados foram expressos em µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido/min/g tecido.



### **3.5.6 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)**

Estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80% foram utilizados para determinar a atividade da MPO. Basicamente o método baseia-se na reação do TMB (tetrametilbenzidina) com a enzima MPO, produzindo coloração azul.

Para a realização dessa técnica o pellet do sobrenadante foi ressuspensionado com 1 ml de Tampão Fosfato 0,08 M com HTAB 0,5% (pH=6,4), sonificado por 5 segundos, e centrifugado por 20 minutos a 10800 rpm a 4 °C. Em microplaca, 30 µl do sobrenadante foram misturados a 200 µl de um mix de soluções (100 µl de Tampão Fosfato 0,08M, 85 µl de Tampão Fosfato 0,22M e 15 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 0,017%). Após, a reação foi iniciada com a adição de 20 µl de TMB, e incubada por 3 minutos a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 30 µl de acetato de sódio (1,46 M, pH = 3,0), e lido em espectrofotômetro a 620 nm.

### **3.5.7 Análise histológica**

A análise histológica foi realizada em estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético 80%. A área lesada foi removida e fixada em ALFAC (solução contendo 85% de álcool a 80%, 10% de formol a 40% e 5% de ácido acético glacial) por 16 horas. Após a fixação, as amostras teciduais foram desidratadas em uma série de banhos alcoólicos com concentrações gradualmente aumentadas e xilol (álcool 70% por 24 horas; álcool 80%, álcool 85%, álcool 90%, álcool 95%, álcool 100% I, álcool 100% II, álcool 100% com xilol P.A. – 1:1 por 30 minutos; e dois banhos de xilol P.A. por 10 minutos cada). Imediatamente após a desidratação, as amostras teciduais foram embebidas em parafina (derretida em estufa a 60 °C e devidamente filtrada), permanecendo na estufa durante 2 horas antes das amostras

serem emblocadas. Após 48 horas da emblocagem, os blocos contendo as amostras foram cortados (com auxílio de um micrótomo - modelo Leica) a 5  $\mu$ m de espessura, e acondicionados em lâminas de vidro contendo albumina de Meyer a 1%. Depois de 24 horas iniciou-se o procedimento de coloração. Para isso, as lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas em banhos contendo xilol e álcool em concentrações decrescentes (xilol P.A. I, xilol P.A. II, álcool 100% com xilol P.A. – 1:1, álcool 100% I, álcool 100% II, álcool 95%, álcool 90%, álcool 80% e álcool 70% durante 5 minutos cada banho; e um banho em água corrente durante 10 minutos). Imediatamente após a desparafinização as lâminas foram banhadas com hematoxilina de Harris durante 1 minuto e 30 segundos, lavadas em água corrente por 10 minutos e dois banhos em água destilada por 2 minutos cada. Em seguida, as lâminas foram coradas com eosina floxina (1%) durante 1 minuto e 30 segundos, e lavadas rapidamente com água destilada. Finalmente as lâminas foram submetidas ao processo de montagem que consistiu em uma bateria de desidratação no qual as lâminas foram banhadas novamente em álcool e xilol em concentrações crescentes (álcool 70%, álcool 80% e álcool 90% durante 30 segundos; álcool 95% durante 5 minutos; três banhos de álcool 100% durante 3 minutos cada; álcool 100% com xilol P.A. – 1:1, xilol P.A. I, xilol II P.A. durante 5 minutos) e então foi feita a montagem das lâminas usando Resina Permont e lamínulas. Os cortes foram observados e fotografados em lupa (Modelo Leica) no aumento de 25 vezes.

### **3.5.8 *Análise estatística***

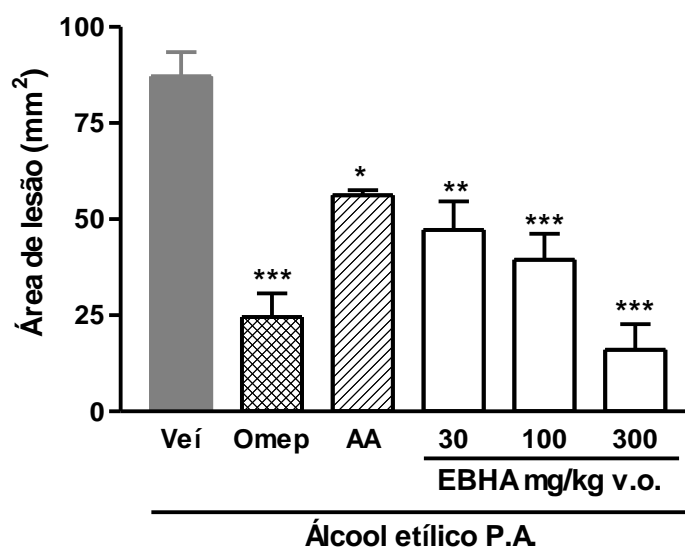
Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias. As diferenças entre as médias foram determinadas através da análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste post-hoc de Bonferroni. As análises foram realizadas

usando *GraphPad Prism* versão 3.0 (*GraphPad Software*, San Diego, EUA). Valores de  $P < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito do EBHA em lesões gástricas induzidas pelo etanol P.A.

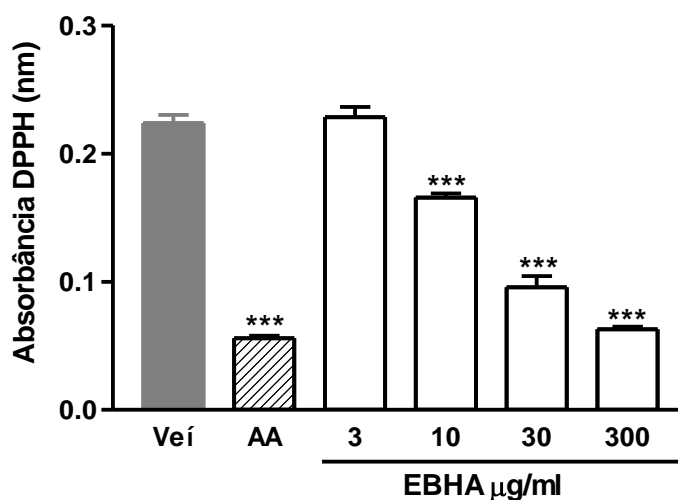
No modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol P.A., o pré-tratamento com o inibidor da bomba de prótons  $H^+K^+/ATPase$  (omeprazol, 40 mg/kg, v.o.) foi capaz de prevenir a formação da lesão gástrica em 71,7% ( $24,6 \pm 6,3 \text{ mm}^2$ ) quando comparado com o grupo veículo (Veí – água) ( $87,1 \pm 6,3 \text{ mm}^2$ ). O EBHA nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg preveniu a formação da lesão gástrica induzida pelo etanol em 35,5% ( $47,2 \pm 7,4 \text{ mm}^2$ ), 56,6% ( $39,5 \pm 6,7 \text{ mm}^2$ ) e 81,5% ( $16,1 \pm 6,7 \text{ mm}^2$ ), respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (Veí – água). Ainda, o pré-tratamento com ácido ascórbico (um antioxidante) na dose de 500 mg/kg v.o., foi capaz de prevenir levemente o desenvolvimento de lesões gástricas em 35,5% ( $56,2 \pm 1,4 \text{ mm}^2$ ) quando comparado ao grupo veículo (**Figura 2**).



**Figura 2.** Efeito gastroprotetor do EBHA em lesões gástricas induzidas por etanol P.A. Os resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6-8 animais. O gráfico representa a área de lesão da mucosa gástrica em  $\text{mm}^2$  após a administração de 0,5 ml de etanol P.A. 1h após o pré-tratamento com veículo (Veí – água v.o.), omeprazol (Omep - 40mg/kg v.o.), ácido ascórbico (AA - 500 mg/kg v.o.) e doses de EBHA (30, 100 e 300 mg/kg v.o.). A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de \*Bonferroni. Diferente do grupo veículo para  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  e \*\*\*  $P < 0,001$ .

## 4.2 Efeito do EBHA sobre o sequestro do radical livre 2,2 –difetil 1- picrilhidrazil (DPPH)

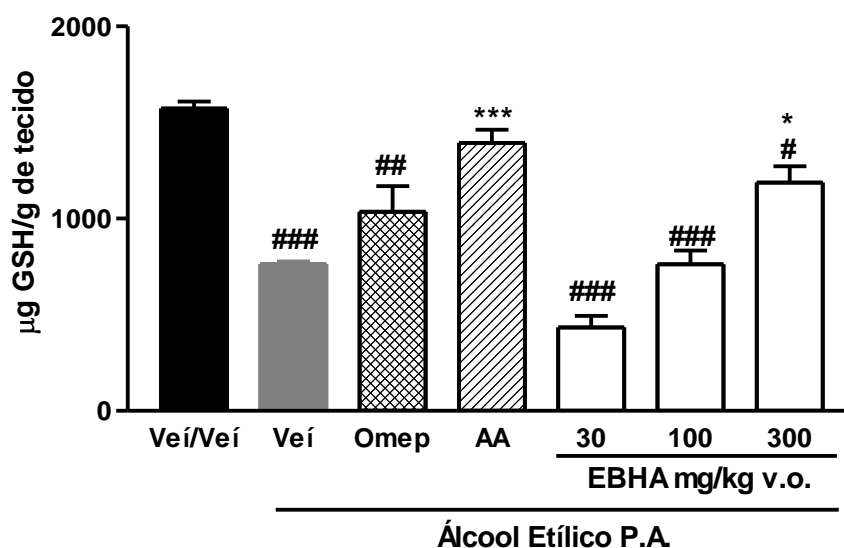
Os dados obtidos demonstram que o ácido ascórbico (50 µg/ml), como esperado, reduziu os níveis de DPPH em 75% ( $0,056 \pm 0,002$  nm) quando comparado com grupo veículo (Veí – água) ( $0,224 \pm 0,006$  nm). Semelhantemente, o EBHA, nas concentrações de 10, 30 e 300 µg/ml também foi capaz de reduzir os níveis de DPPH em 26,3% ( $0,165 \pm 0,003$  nm), 57,6% ( $0,095 \pm 0,008$  nm) e 71,8% ( $0,063 \pm 0,002$  nm), respectivamente, (Figura 3).



**Figura 3.** Efeito do EBHA no sequestro do radical livre DPPH. O gráfico representa a capacidade dos grupos experimentais em sequestrar o radical livre DPPH, sendo eles veículo (Veí – água), ácido ascórbico (50 µg/ml), e EBHA nas concentrações de 3, 10, 30 e 300 µg/ml. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias, e a diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni \*\*\*Diferente do grupo veículo para  $P < 0,001$ .

#### 4.3 Efeito do EBHA sobre o conteúdo de GSH na região glandular do estômago após indução de lesão pelo etanol P.A.

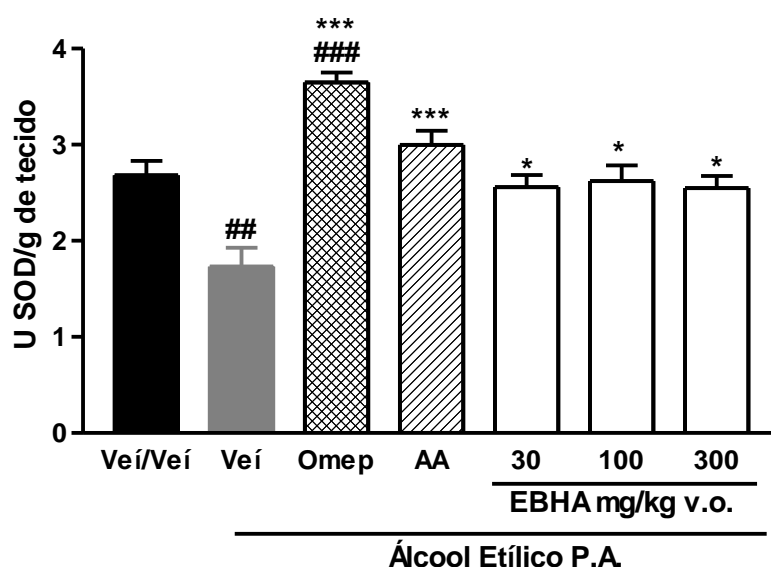
Os níveis basais de GSH na região glandular da mucosa gástrica de animais que não receberam etanol (grupo veículo/veículo) encontravam-se em torno de  $1572 \pm 37,8$   $\mu\text{g}$  GSH/g tecido. A administração de etanol P.A. (grupo veículo), reduziu os níveis de GSH na mucosa gástrica em 51,4% ( $764,3 \pm 13,8$   $\mu\text{g}$  GSH/g tecido), entretanto, o pré-tratamento com ácido ascórbico (500 mg/kg v.o.) foi capaz de impedir a queda dos níveis de GSH desencadeada pela administração do etanol ( $1394 \pm 68,6$   $\mu\text{g}$  GSH/g tecido). O pré-tratamento com o EBHA não foi capaz de impedir a redução dos níveis de GSH, porém, observamos que de maneira dependente da dose existe uma tendência do extrato em manter o GSH à níveis basais, sendo que o pré-tratamento com a maior dose apresentou menor queda dos níveis de GSH ( $1187 \pm 84,9$   $\mu\text{g}$  GSH/g tecido) (Figura 4).



**Figura 4.** Efeito do EBHA sobre o conteúdo de GSH na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol P.A. O gráfico representa os níveis de GSH nos grupos experimentais veículo/veículo (Veí/Veí – água/água), veículo (Veí – etanol/água), omeprazol (Omep - 40 mg/kg v.o.), ácido ascórbico (AA – 500 mg/kg v.o.) e EBHA nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg v.o. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 8 animais. A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ### Diferente do grupo Veí/Veí para  $P<0,001$  e ## para  $P<0,01$ ; \*\*\* diferente do grupo Veí para  $P<0,001$ .

#### 4.4 Efeito do EBHA sobre a atividade da SOD na região glandular do estômago após indução de lesão pelo etanol P.A.

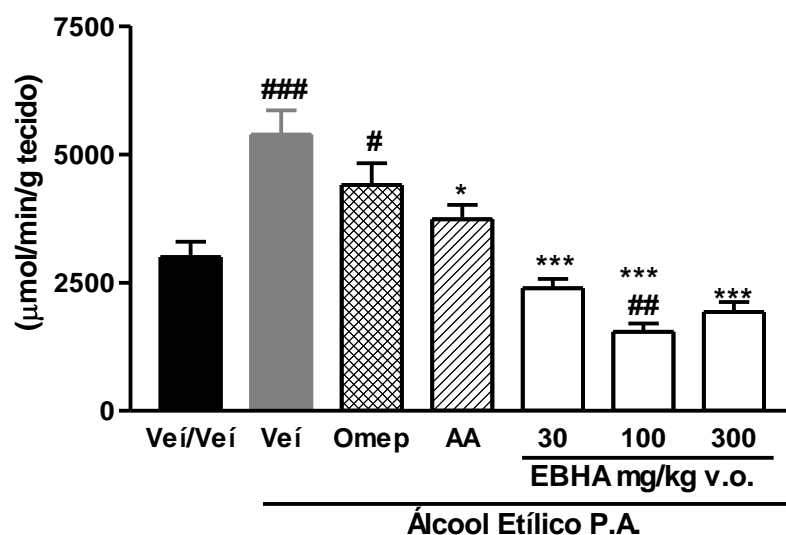
A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na região glandular da mucosa gástrica nos animais que não receberam etanol (grupo veículo/veículo) foi de  $2,7 \pm 0,2$  U SOD/g tecido. Por outro lado a administração de etanol P.A. (grupo veículo) reduziu significativamente a atividade da SOD para  $1,7 \pm 0,2$  U SOD/g tecido. O pré-tratamento com o omeprazol e ácido ascórbico foi capaz de prevenir a redução da atividade da SOD desencadeada pela administração do etanol ( $3,6 \pm 0,1$  e  $3,0 \pm 0,1$  U SOD/g tecido, respectivamente). O mesmo foi observado com o pré-tratamento com o EBHA nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg em que foi obtido valores de  $2,5 \pm 0,1$ ;  $2,6 \pm 0,1$  e  $2,5 \pm 0,1$  U SOD/g tecido, respectivamente (**Figura 5**).



**Figura 5.** Efeito do EBHA sobre a atividade da SOD na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol P.A. O gráfico representa a quantificação da atividade de SOD nos grupos experimentais veículo/veículo (Veí/Veí – água/água), veículo (Veí – etanol/água), omeprazol (Omep – 40 mg/kg v.o.), ácido ascórbico (AA – 500 mg/kg v.o.) e EBHA nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg v.o. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 8 animais. A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ### Diferente do grupo Veí/Veí para  $P < 0,001$  e ## para  $P < 0,01$ ; \*\*\* diferente do grupo Veí para  $P < 0,001$  e \* para  $P < 0,05$ .

#### 4.5 Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular do estômago após indução de lesão pelo etanol P.A.

A atividade da enzima catalase (CAT) na região glandular da mucosa gástrica de ratos que não foram tratados com etanol (grupo veículo/veículo) foi de  $2998 \pm 301,5$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  tecido. A lesão gástrica induzida pelo etanol (grupo veículo) promoveu um aumento da atividade da CAT para  $5383 \pm 475,1$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  tecido, quando comparado com o grupo veículo/veículo. O pré-tratamento com o omeprazol não foi capaz de prevenir o aumento da atividade da CAT induzida pelo etanol ( $4402 \pm 428,9$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  tecido). Entretanto, o pré-tratamento com o ácido ascórbico e o EBHA nas doses de 30 e 300 mg/kg, foram capazes de prevenir o aumento da atividade da CAT, obtendo valores de  $3735 \pm 281,0$ ;  $2388 \pm 180,9$  e  $1925 \pm 198,2$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  tecido, respectivamente) (**Figura 6**).

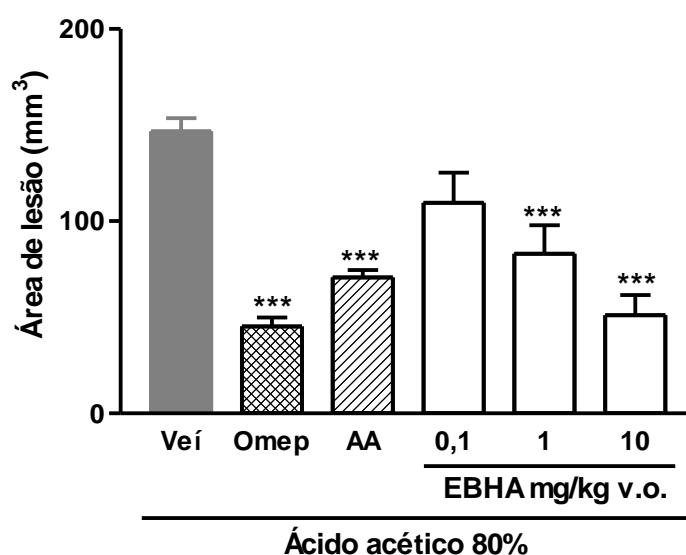


**Figura 6.** Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol P.A. O gráfico representa a quantificação da atividade da CAT nos grupos experimentais veículo/veículo (Veí/Veí – água/água), veículo (Veí – etanol/água), omeprazol (Omepr – 40 mg/kg v.o.), ácido ascórbico (AA – 500 mg/kg v.o.) e EBHA nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg v.o. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 8 animais. A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ### Diferente do grupo Veí/Veí para  $P < 0,001$ , ## para  $P < 0,01$  e # para  $P < 0,05$ ; \*\*\* diferente do grupo Veí para  $P < 0,001$  e \* para  $P < 0,05$ .



#### 4.6 Efeito do EBHA em lesões gástricas induzidas pelo ácido acético 80%

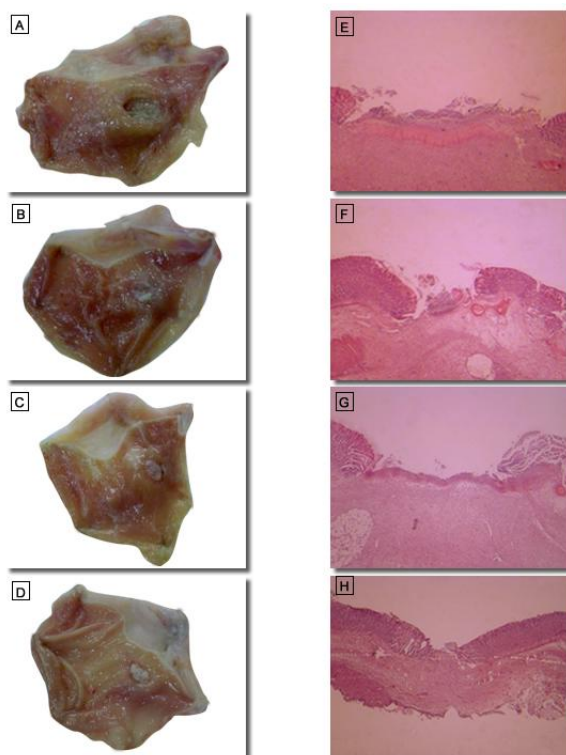
A lesão gástrica induzida pelo ácido acético produziu uma média de área lesada de  $146,7 \pm 6,8 \text{ mm}^3$  (grupo veículo), e o omeprazol foi capaz de reduzir a área de lesão em 69,2% ( $45,2 \pm 4,6 \text{ mm}^3$ ) quando comparado ao grupo veículo. O tratamento com o ácido ascórbico (250 mg/kg v.o.) foi capaz de promover melhora no processo de resolução da lesão gástrica reduzindo a área de lesão em 51,7% ( $70,8 \pm 3,8 \text{ mm}^3$ ). Da mesma forma, o tratamento com o EBHA nas doses de 1 e 10 mg/kg v.o., reduziu a área de lesão gástrica de  $146,7 \pm 6,8 \text{ mm}^3$  para  $83,0 \pm 14,8 \text{ mm}^3$  (43,4% de redução da lesão) e  $51 \pm 10,6 \text{ mm}^3$  (65,2% de redução de lesão) (**Figura 7**).



**Figura 7.** Efeito gastroprotetor do EBHA em lesões gástricas induzidas pelo ácido acético 80%. O gráfico representa o índice de lesão da mucosa gástrica em  $\text{mm}^3$ , após sete dias de tratamento, duas vezes ao dia, com veículo (Veí – água v.o.), omeprazol (Omep - 40mg/kg v.o.), ácido ascórbico (AA – 250 mg/kg v.o.) e EBHA (0,1, 1 e 10 mg/kg v.o.). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6-9 animais. A diferença entre os grupos foram determinadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. \*\*\* Diferente do grupo veículo para  $P < 0,001$  e \*\* para  $P < 0,01$ .

#### 4.7 Análise macroscópica e histológica das úlceras gástricas após lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80%

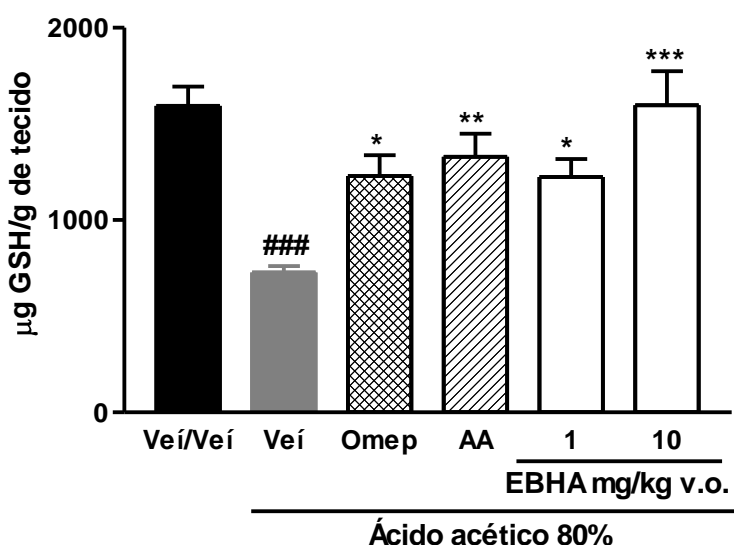
Imagens macroscópicas de estômagos submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético revelou que o tratamento crônico com omeprazol (40 mg/kg, painel B) e EBHA (1 e 10 mg/kg, painel C e D, respectivamente) promoveu melhora na resolução das lesões, quando comparado com o grupo controle (painel A). A análise histológica revelou a presença de úlceras penetrantes na parede da mucosa gástrica desencadeada pela lesão induzida pelo ácido acético 80%. Além disso, a análise histológica também confirmou a ação gastroprotetora promovida pelo omeprazol e EBHA (1 e 10 mg/kg) após sete dias de tratamento (painel F, G e H, respectivamente), exercendo significativa regeneração da mucosa gástrica (**Figura 8**).



**Figura 8.** Efeito do tratamento com o EBHA sobre a regeneração da mucosa gástrica após lesão induzida pelo ácido acético 80%. As imagens representam fotografias macroscópicas e cortes histológicos das lesões gástricas após sete dias de tratamento com veículo água v.o. (**A e E**), omeprazol 40 mg/kg v.o. (**B e F**), EBHA 1mg/kg v.o. (**C e G**) e EBHA 10 mg/kg v.o. (**D e H**). As secções de estômagos foram analisadas com auxílio de uma lupa (LEICA, modelo Wild M3Z) e fotografadas com aumento de 25 vezes.

#### 4.8 Efeito do EBHA sobre o conteúdo de GSH na região glandular do estômago após indução de lesão gástrica pelo ácido acético 80%

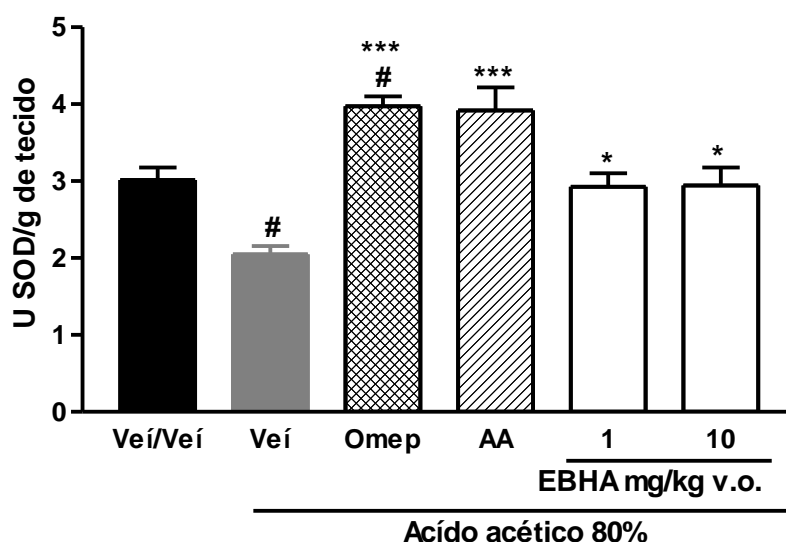
O nível de GSH na região glandular da mucosa gástrica dos animais que não foram lesados pelo ácido acético (grupo veículo/veículo) foi de  $1595 \pm 98,9$   $\mu\text{g}$  GSH/g tecido, porém em animais submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético (grupo veículo) foi observada uma redução dos níveis de GSH na região glandular da mucosa gástrica em 54,3% ( $728,2 \pm 32,6$   $\mu\text{g}$  GSH/g tecido). O tratamento com o ácido ascórbico (250 mg/kg v.o.), omeprazol (40 mg/kg v.o.) bem como o EBHA nas doses de 1 e 10 mg/kg v.o., foram capazes de reverter a redução de GSH, restabelecendo o sistema antioxidante a níveis basais ( $1329 \pm 120,3$ ;  $1229 \pm 109,3$ ;  $1224 \pm 94,6$  e  $1597 \pm 177,2$   $\mu\text{g}$  GSH/g tecido, respectivamente (**Figura 9**).



**Figura 9.** Efeito do EBHA sobre o conteúdo de GSH na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético 80%. O gráfico representa os níveis de GSH nos grupos experimentais veículo/veículo (Veí/Veí - água/água), veículo (Veí - ácido acético/água), ácido ascórbico (AA - 250 mg/kg v.o.) e EBHA nas doses 1 e 10 mg/kg v.o.. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6-9 animais. A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ### Diferente do grupo Veí/Veí para  $P < 0,001$ ; \*\*\* diferente do grupo Veí para  $P < 0,001$ , \*\* para  $P < 0,01$  e \* para  $P < 0,05$ .

#### 4.9 Efeito do EBHA sobre a atividade de SOD na região glandular do estômago após indução de lesão gástrica pelo ácido acético 80%

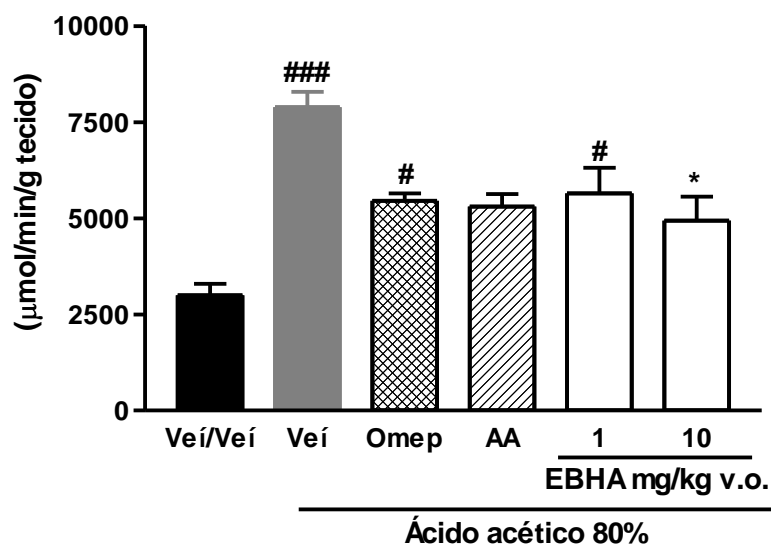
A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) na região glandular da mucosa gástrica dos animais que não foram submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético (grupo veículo/veículo) foi de  $3,0 \pm 0,1$  U SOD/g tecido. Animais ulcerados (grupo veículo) apresentaram redução da atividade da SOD para  $2,0 \pm 0,1$  U SOD/g tecido. O tratamento com omeprazol (40 mg/kg v.o.) e ácido ascórbico (250 mg/kg v.o.) foram capazes de restabelecer a atividade da SOD à níveis basais ( $3,9 \pm 0,1$  e  $3,9 \pm 0,3$  U SOD/g de tecido, respectivamente). Além disso, o tratamento com o EBHA nas duas doses testadas (1 e 10 mg/kg v.o.) também foi capaz de reverter a atividade da SOD à níveis basais ( $2,9 \pm 0,2$  e  $2,9 \pm 0,2$  U SOD/g tecido, respectivamente) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Efeito do EBHA sobre a atividade da SOD na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético. O gráfico representa a quantificação da atividade de SOD nos grupos experimentais veículo/veículo (Veí/Veí – água/água), veículo (Veí – ácido acético/água), omeprazol (Omepr – 40 mg/kg v.o.), ácido ascórbico (250 mg/kg v.o.) e EBHA nas doses de 1 e 10 mg/kg v.o.. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6-9 animais. A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. # Diferente do grupo Veí/Veí para  $P < 0,05$  e \*diferente do grupo Veí para  $P < 0,05$ .

#### 4.10 Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular do estômago após indução de lesão gástrica pelo ácido acético 80%

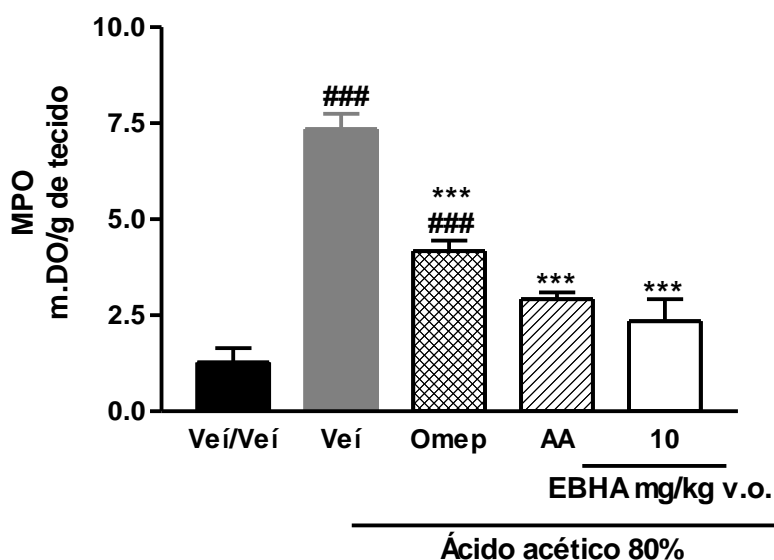
A atividade da enzima catalase (CAT) na região glandular da mucosa gástrica de ratos que não foram submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético (grupo veículo/veículo) foi de  $2998 \pm 301,5$   $\mu\text{mol/min/g}$  tecido. A lesão gástrica induzida pelo ácido acético (grupo veículo) promoveu um aumento da atividade da CAT para  $7891 \pm 398,6$   $\mu\text{mol/min/g}$  tecido, quando comparado com o grupo veículo/veículo. O tratamento com o omeprazol (40 mg/kg v.o.) e ácido ascórbico (250 mg/kg v.o.) não foi capaz de prevenir o aumento da atividade da CAT induzida pelo ácido acético ( $5455 \pm 193,1$  e  $5306 \pm 325,1$   $\mu\text{mol/min/g}$  tecido, respectivamente). Entretanto, o tratamento com o EBHA na doses de 10 mg/kg, foi capaz de reverter o aumento da atividade da CAT a níveis basais ( $4938 \pm 626,3$   $\mu\text{mol/min/g}$  tecido) (**Figura 11**).



**Figura 11.** Efeito do EBHA sobre a atividade da CAT na região glandular da mucosa de ratos submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80%. O gráfico representa a quantificação da atividade da CAT nos grupos experimentais veículo/veículo (Veí/Veí – água/água), veículo (Veí – ácido acético/água), omeprazol (Omep – 40 mg/kg v.o.), ácido ascórbico (AA – 250 mg/kg v.o.) e EBHA nas doses de 1 e 10 mg/kg v.o. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 8 animais. A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ### Diferente do grupo Veí/Veí para  $P < 0,001$  e # para  $P < 0,05$ ; \* diferente do grupo Veí para  $P < 0,05$ .

#### 4.11 Efeito do EBHA sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) após indução de lesão gástrica pelo ácido acético a 80%.

A atividade da MPO no grupo veículo/veículo (grupo não lesado) foi de  $1,3 \pm 0,4$  m.DO/g de tecido. No entanto, em estômagos lesados pelo ácido acético 80% foi observado um aumento da atividade da MPO de 82,2% ( $7,3 \pm 0,4$  m.DO/g de tecido) quando comparado com o grupo veículo/veículo. O tratamento com o omeprazol (40 mg/kg v.o.) promoveu redução da atividade da MPO quando comparado com o grupo veículo (grupo lesado), porém não completamente ( $4,2 \pm 0,3$  m.DO/g de tecido). Por outro lado, o tratamento com o ácido ascórbico (250 mg/kg v.o.) e o EBHA na dose de 10 mg/kg foram capazes de reduzir completamente a atividade da MPO ( $2,9 \pm 0,2$  e  $2,3 \pm 0,6$  m.DO / g tecido, respectivamente), indicando que o extrato foi capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos com conseqüente redução da atividade da MPO (**Figura 12**).



**Figura 12.** Efeito do EBHA sobre a atividade da MPO. O gráfico representa a atividade da MPO, em estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida pelo ácido acético 80%, nos grupos experimentais veículo/veículo (Veí/Veí – água/água), veículo (Veí – ácido acético/água), omeprazol (Omepr – 40 mg/kg v.o.), ácido ascórbico (AA – 250 mg/kg v.o.) e EBHA na dose de 10 mg/kg v.o.. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão das médias de 6-9 animais. A diferença entre os grupos foi determinada por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni. ### Diferente do grupo veículo/veículo para  $P < 0,001$  e \*\*\* diferente do grupo veículo para  $P < 0,001$ .

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo comprovar e investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação gastroprotetora do extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que o tratamento por via oral com o EBHA, bem como omeprazol (inibidor da bomba de prótons -  $H^+/K^+ATPase$ ) apresentam efeitos gastroprotetores no modelo de úlcera gástrica induzida agudamente por etanol e cronicamente por ácido acético. Estes resultados estendem e reforçam os dados obtidos anteriormente, no qual o extrato aquoso da *Achillea millefolium* L. causou potente efeito anti-secretor gástrico basal e quando estimulado por histamina ou betanecol; efeito este, relacionado à inibição da  $H^+/K^+ATPase$  pelo extrato aquoso das folhas e sua fração hexânica. Além disso, o extrato promoveu a redução de úlceras gástricas induzida por etanol, indometacina e ácido acético (BAGGIO *et al.*, 2002; BAGGIO *et al.*, 2005) e ausência de sinais de toxicidade hematológica, hepática e renal (CAVALCANTI, *et al.*, 2006).

Os modelos experimentais empregados para a avaliação da atividade gastroprotetora do EBHA foram selecionados por envolverem diferentes agentes e mecanismos relacionados à indução de lesões gástricas. De maneira geral, a formação de úlceras em modelos experimentais bem como aquelas observadas em humanos é decorrente do desequilíbrio entre os fatores protetores (tais como muco, bicarbonato, prostaglandinas, óxido nítrico, grupos sulfidrílicos não-protéicos e fluxo sanguíneo) e fatores lesivos (ácido clorídrico, pepsina, proteases e radicais livres) (GLAVIN e SZABO, 1992).

O modelo de lesão gástrica induzida pelo etanol tem sido utilizado como ferramenta para estudar efeitos gastroprotetores de diferentes compostos, bem como dos

mecanismos envolvidos na patologia da úlcera gástrica aguda. Apesar deste modelo não representar integralmente a patologia humana, considerando que as lesões gástricas em roedores são superficiais, múltiplas e induzidas por diferentes mecanismos, este modelo continua sendo de grande relevância e amplamente utilizado em estudos experimentais.

Tem sido observado que o consumo de álcool pode gerar erosão gástrica hemorrágica aguda em humanos, sendo que o uso crônico pode resultar em gastrite, caracterizada por edema da mucosa, hemorragia sub-epitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias (MATSUHASHI, *et al.*, 2007). Por ser um agente necrotizante de ação direta na mucosa gástrica, o etanol induz lesões gástricas através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, danos no endotélio vascular, desordem da microcirculação e isquemia, com consequente produção de radicais livres, acarretando no aparecimento de lesões gástricas hemorrágicas. Além disso, o etanol também induz liberação de endotelinas, degranulação de mastócitos e inibição da síntese de prostaglandinas, resultando na redução da produção de muco (PAN, *et al.*, 2008).

Neste estudo, foi observado que o pré-tratamento com o EBHA protegeu a mucosa gástrica dos ratos contra as úlceras induzidas pelo etanol, sugerindo uma ação citoprotetora exercida pelo extrato. Além disso, o efeito gastroprotetor do EBHA foi dependente da dose, sendo que na maior dose utilizada (300 mg/kg), a redução da área ulcerada foi semelhante a observada pelo tratamento dos animais com omeprazol, utilizado como controle positivo. Ainda, o pré-tratamento com o ácido ascórbico (um antioxidante) também protegeu levemente a mucosa gástrica das lesões produzidas pelo etanol.

Além dos mecanismos já citados, as lesões gástricas induzidas pelo etanol estão relacionadas à diminuição dos níveis de GSH, levando ao aumento de EROs (MATSUHASHI, *et al.*, 2007). Corroborando com esta informação, o estudo realizado



por BAGGIO e colaboradores (2005) demonstrou que o extrato bruto aquoso das folhas da *Achillea millefolium* reduziu as lesões gástricas promovidas pelo etanol, atribuindo o referido efeito gastroprotetor ao aumento da quantidade de GSH na mucosa gástrica, impedindo a ação lesiva dos radicais livres sobre as células do estômago.

De maneira semelhante, as lesões gástricas causadas por estresse, *Helicobacter pylori*, ácido acético e pelo uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) também são parcialmente mediadas pela geração de EROs (BANDYOPADHYAY, *et al.*, 2001). Estudos recentes têm investigado o papel de EROs em distúrbios microvasculares relacionados à lesão da mucosa gástrica em diferentes modelos experimentais, incluindo isquemia e reperfusão, lesão gástrica induzida por AINEs, ácido acético e pela ingestão de álcool (ODABASOGLU, *et al.*, 2005; DEVI, *et al.*, 2007; MOTAWI, *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008). Esses radicais podem ser gerados pela atividade da xantina oxidase como uma consequência da lesão por reperfusão seguido de isquemia, e acredita-se ser uma importante causa de dano e destruição de membranas celulares. Além disso, os radicais formados podem modificar a fluidez e permeabilidade da membrana, aumentar taxas de degradação e principalmente ocasionar lise celular (MOTILVA, *et al.*, 1996). Neste sentido, vários estudos têm demonstrado a eficácia de agentes antioxidantes como protetores da mucosa gástrica em vários modelos de indução de úlceras gástricas.

No presente estudo, inicialmente foi investigado se o EBHA em si seria capaz de seqüestrar radicais livres em um modelo experimental *in vitro*. O resultado obtido demonstrou que o EBHA foi capaz de sequestrar o radical livre DPPH, de maneira muito semelhante ao ácido ascórbico, confirmando assim seu potencial antioxidante.

Com o intuito de investigar se a capacidade do extrato em sequestrar radicais livres era o responsável pelo efeito gastroprotetor no modelo de úlcera aguda induzida por etanol, foram analisadas o envolvimento de enzimas antioxidantes.

Confirmando os dados já demonstrados na literatura, o presente estudo observou que em estômagos submetidos à lesão gástrica induzida por etanol, a atividade das enzimas SOD, CAT, bem como os níveis de GSH estavam alterados. O pré-tratamento com EBHA em diferentes doses foi capaz de prevenir a redução dos níveis de GSH e atividade da SOD causado pela administração do etanol. Semelhantemente, o pré-tratamento com o omeprazol e o ácido ascórbico preveniram a redução dos níveis de GSH e atividade da SOD. A SOD é uma metaloproteína que dismuta o radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) para peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio molecular ( $O_2$ ) (FRIDOVICH, 1986; McCORD e FRIDOVICH, 1988). O dano causado pelo etanol produz aumento dos níveis do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), provocando aumento da atividade da SOD, gerando grandes quantidades de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O  $H_2O_2$  não é um radical livre, porém participa do processo de formação do radical hidroxila ( $^{\bullet}OH$ ), que é extremamente reativo e responsável por gerar lesão em alguns sistemas orgânicos (NORDBERG e ARNER, 2001). O  $H_2O_2$  formado é convertido em água e oxigênio molecular pela atividade da CAT e também pela atividade de outra enzima antioxidante, a glutathione peroxidase (GPx), cujo substrato é a GSH (KIRKMAN e GAETANI, 1984; KIRKMAN *et al.*, 1999). Interessantemente, nossos resultados demonstram que o etanol reduz a atividade da SOD, e aumenta a atividade da CAT. Sugerimos então, que outros mecanismos possam estar desencadeando a formação de  $H_2O_2$ , promovendo um aumento da atividade da CAT, ou que em um primeiro momento, durante o período de exposição do agente irritante na mucosa, houve aumento da concentração de  $O_2^{\bullet-}$ , ativando a SOD, produzindo grandes quantidades de

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e no decorrer desse período de exposição, a atividade da SOD foi reduzida. Esse mesmo resultado foi obtido no modelo de lesão gástrica induzida pelo ácido acético. De qualquer forma, outros estudos devem ser realizados para melhor entender o envolvimento e funcionamento das enzimas antioxidantes durante os processos de lesão.

Sabe-se que a GSH participa da proteção da mucosa pela ligação aos radicais-livres (efeito antioxidante) e por formar pontes de dissulfeto entre as subunidades do muco, de maneira a impedir a sua dissociação e, portanto, a depleção desses grupamentos parece estar envolvida na formação da lesão (AVILA *et al.*, 1996). Nesse sentido, a GSH tem importância na redução do estresse oxidativo por eliminar radicais livres, reduzir os peróxidos e formar complexos com compostos eletrofílicos, de maneira a proteger estruturas celulares protéicas (DNA e lipídeos), além de proteger a célula de outros produtos tóxicos (KLAASSEM *et al.*, 1985; HAYES e MCLELLAN, 1999; KIMURA *et al.*, 2001). A análise dos níveis de GSH no tecido ulcerado revelou redução da mesma após administração de etanol, a qual foi revertida pelo tratamento dos animais com o EBHA. Sob condições de estresse oxidativo, como no modelo de úlcera induzida por etanol, EROs são reduzidas pelo GSH com a concomitante formação de glutatona oxidada (GSSG). Além da sua ação como um antioxidante químico, o GSH também atua na primeira linha de defesa antioxidante como um co-fator da GPx na redução de peróxidos, que também resulta na formação de GSSG. Em circunstâncias fisiológicas normais o GSSG é reduzido a GSH pela glutatona redutase à custa de NADPH (CNUBBEN *et al.*, 2001).

Até o momento, estes resultados sugerem que no modelo de lesão gástrica aguda induzida por etanol o efeito gastroprotetor do EBHA parece envolver o aumento da quantidade de GSH na mucosa gástrica e o restabelecimento do sistema antioxidante,

impedindo a ação lesiva dos radicais livres, bem como prevenindo a formação de lesão gástrica.

Contudo, para melhor compreender os mecanismos envolvidos no efeito gastroprotetor causado pelo EBHA, também foi utilizado o modelo de úlcera crônica induzida pelo ácido acético. Já foi demonstrado que a aplicação de ácido acético na superfície da serosa de estômagos de ratos resulta em úlceras muito semelhantes às observadas em humanos em termos de localização, severidade e cronicidade, bem como no que diz respeito ao processo de cicatrização (OKABE e PFEIFFER, 1972). Além disso, a úlcera gástrica induzida pelo ácido acético envolve alterações nos níveis de prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico, citocinas e na quantidade de muco (KOBAYASHI *et al.*, 2001).

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento dos animais por sete dias com omeprazol reduziu significativamente a úlcera gástrica induzida por ácido acético. De maneira semelhante, o tratamento com o EBHA também protegeu a mucosa gástrica das lesões causadas pelo ácido acético. Apesar de o EBHA apresentar a mesma eficácia que o omeprazol, seu efeito gastroprotetor foi mais potente, já que com uma dose menor (10 mg/kg) foi capaz de promover efeito máximo. Além disso, o tratamento com o ácido ascórbico também promoveu melhora na resolução das lesões gástricas induzidas pelo ácido acético. Adicionalmente, os resultados *in vivo* foram confirmados pela análise histológica das lesões gástricas, a qual revelou a presença de úlceras penetrantes na parede da mucosa gástrica após a administração do ácido acético. A análise histológica também confirmou a ação gastroprotetora causada pelo EBHA, em que foi observada significativa regeneração da mucosa gástrica, assim como observado para os animais tratados com omeprazol. Inúmeros trabalhos já demonstraram que o omeprazol, bem como outros inibidores da bomba de prótons, acelera a cicatrização de

úlceras gástricas (induzidas por ácido acético) e duodenais (OLSEN, *et al.*, 1988; TAKEUCHI, *et al.* 1999). Basicamente, a melhora na cicatrização de úlceras gástricas promovido pelo omeprazol deve-se à supressão da secreção do ácido gástrico. Entretanto, os mecanismos de cicatrização do tecido envolvem múltiplas etapas como: formação do tecido de granulação, contração do tecido ulcerado e re-epitelização, sendo provável que esses inibidores da bomba de prótons promovam a cicatrização ao afetarem uma dessas etapas, além de inibir a produção de ácido (TAKEUCHI, *et al.* 1999).

Semelhante aos resultados observados na úlcera gástrica induzida pelo etanol, a administração de ácido acético 80% também causou significante alterações nos níveis de GSH. A alteração dessa enzima poderia ter resultado num aumento da concentração do ânion superóxido, com subsequente aumento da lesão gástrica. Porém, a redução de GSH observada após a administração de ácido acético na serosa foi revertida pelo tratamento com EBHA na maior dose (10 mg/kg) e também pelo tratamento com o ácido ascórbico. Além disso, nós observamos que em tecidos lesados pelo ácido acético, a atividade da SOD estava reduzida, enquanto que em tecidos não ulcerados a atividade da SOD estava aumentada. Esse resultado está de acordo com trabalho publicado por ISHIHARA e colaboradores (2008), os quais observaram o mesmo padrão de atividade da SOD neste modelo de lesão gástrica. Adicionalmente, o tratamento com o EBHA reverteu completamente a atividade da SOD a níveis basais.

Esses resultados sugerem que no modelo de úlcera crônica estudado, pode ocorrer formação de EROs, bem como alterações nas enzimas antioxidantes, e mais uma vez o EBHA mostrou-se capaz de restabelecer o sistema antioxidante.

O entendimento dos mecanismos que levam a formação das lesões gástricas crônicas ainda é pouco compreendido e existem poucas informações com relação ao

processo inflamatório e formação de EROs no desenvolvimento e restabelecimento deste tipo de lesão. Tem sido proposto que a produção de radicais livres oriundos da via xantina oxidase poderiam, em parte, ser responsáveis pela formação de úlceras induzidas por ácido acético (TATSUMI, 1990). Além disso, a xantina oxidase também estaria envolvida na lesão gastrointestinal mediada por neutrófilos (GRISHAM *et al.*, 1986). Dessa maneira, os radicais livres derivados da xantina oxidase poderiam atrair neutrófilos para a mucosa gástrica e, a ativação dos mesmos, resultaria em lesões na microcirculação com a conseqüente liberação de radicais livres ou proteases (HERNÁNDEZ, *et al.*, 1987). No entanto, MOTILVA e colaboradores (1996) demonstraram que radicais livres derivados da xantina oxidase não participam na formação de úlceras crônicas induzidas por ácido acético, uma vez que o inibidor competitivo de xantina oxidase não apresentou qualquer efeito gastroprotetor nesse modelo de lesão gástrica, sugerindo que radicais livres derivados de neutrófilos possam exercer um importante papel nesse tipo de lesão. De fato, a hidroxiuréia (efetiva em reduzir o número de neutrófilos) foi capaz de reduzir a atividade da MPO e diminuir a severidade das lesões gástricas causadas por ácido acético (TAKEUCHI, *et al.*, 1991).

Estudos recentes também têm evidenciado o papel de radicais livres derivados da reatividade de neutrófilos em diversos modelos de lesão gástrica, ou seja, o recrutamento excessivo e ativação metabólica de neutrófilos podem resultar em danos teciduais dependente do processo inflamatório (FIALKOW, *et al.*, 2007). Os neutrófilos possuem na membrana celular um complexo enzimático denominado NADPH oxidase, que quando ativado (principalmente durante o processo de fagocitose), gera grandes quantidades de EROs (FIALKOW, *et al.*, 2007). Além disso, os neutrófilos constituem uma importante fonte de radicais livres na mucosa gástrica de humanos e animais (SAKURAI *et al.*, 2005). A enzima MPO, presente nos neutrófilos, atua na presença do

ânion superóxido e do ânion cloreto ( $\text{Cl}^-$ ) para formar o ácido hipoclorídrico (o qual apresenta ação tóxica sobre as bactérias), porém também acaba sendo lesivo para as células do tecido (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2006). Dessa maneira, tem sido sugerido que a diminuição da infiltração de neutrófilos em tecidos ulcerados resultaria na melhora da úlcera gástrica induzida por ácido acético em ratos, por haver redução da formação de EROs dependente de neutrófilos.

Para verificar se o EBHA estava interferindo no recrutamento de neutrófilos após a administração de ácido acético, foi avaliada a atividade da enzima MPO em estômagos previamente submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético. Os resultados demonstraram um aumento significativo da atividade da MPO em estômagos de animais com lesão gástrica induzida pelo ácido acético, o qual foi completamente revertido pelo tratamento dos animais com o EBHA e com o ácido ascórbico. A mensuração da atividade da MPO pode ser utilizada como um índice que avalia a resposta inflamatória dependente de neutrófilos em uma variedade de estados clínicos e experimentais (DEVI, *et al.*, 2007). Dessa forma, é possível sugerir que a inibição da infiltração de neutrófilos representa uma importante atividade antiinflamatória gástrica, a qual parece contribuir grandemente para o efeito gastroprotetor promovido pelo EBHA.

Até o momento, não foi possível identificar quais os prováveis compostos presentes no EBHA que seriam responsáveis pela ação protetora gástrica. No entanto, através de um método quantitativo utilizando o ensaio de HPLC-DPPH, RAUDONIS e colaboradores (2009) encontraram ácido clorogênico e os flavonóides luteolina-7-*O*-glicosídeo, rutina e luteolina no extrato etanólico 70% da *Achillea millefolium*, os quais atuaram como sequestradores de radicais livres no referido ensaio. Reforçando as propriedades antioxidantes de diferentes preparações desta planta, foi observado que a

infusão de flores de *Achillea millefolium* L. restabeleceram a atividade da CAT, SOD e da GPx no ensaio de estresse oxidativo induzido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em eritrócitos e leucócitos humanos (KONYALIOGLU e KARAMENDERES, 2005).

Considerando o efeito de flavonóides na úlcera gástrica induzida por etanol, BAGGIO e colaboradores (2004) observaram que a rutina reduziu o aparecimento de lesões na mucosa gástrica de ratos, efeito que foi atribuído à sua propriedade antioxidante, mais especificamente pelo efeito anti-lipoperoxidante e sequestrador de radicais hidroxil e superóxido, sabidamente envolvidos na lesão tecidual (LA CASA *et al.*, 2000).

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o tratamento por via oral com o extrato bruto hidroalcoólico da *Achillea millefolium* promoveu a melhora da úlcera gástrica aguda e crônica induzida por etanol e ácido acético, respectivamente. Estes resultados sugerem que o efeito protetor do EBHA na úlcera gástrica induzida por etanol e ácido acético pode estar relacionado, em parte ao efeito positivo no sistema antioxidante. No modelo de úlcera crônica induzida por ácido acético esse efeito parece estar relacionado também a outros mecanismos, tais como a inibição da infiltração de neutrófilos e a subsequente redução na produção de EROs. No entanto, não podemos descartar a participação de outros mecanismos que poderiam estar envolvidos na atividade gastroprotetora do EBHA. Dessa maneira, novos estudos devem ser realizados para um completo entendimento dos mecanismos de ação gastroprotetora do extrato hidroalcoólico da *Achillea millefolium* L.



## 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, conclui-se que o EBHA:

- Apresentou atividade gastroprotetora em modelos de lesão gástrica aguda induzida por etanol e lesão gástrica crônica induzida por ácido acético.
- Promoveu significativa regeneração do epitélio da mucosa gástrica em animais submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético.
- Apresentou capacidade em sequestrar radicais livres, demonstrando seu potencial antioxidante.
- Promoveu o restabelecimento de sistemas antioxidantes que se apresentavam alterados após a indução das lesões gástricas com etanol ou ácido acético.
- Reduziu completamente a infiltração de neutrófilos em estômagos submetidos à lesão gástrica induzida por ácido acético, indicando que é capaz de melhorar o processo inflamatório.

## 7. REFERÊNCIAS

ADAMS, J.D.; ODUNZE, I.N. Oxygen free radicals and Parkinson`s disease. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 10, p. 161-169, 1991.

ALY, A.; SHULKES, A.; BALDWIN, GS. Gastrins, cholecystokinins and gastrointestinal cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1704, p. 1 – 10, 2004.

AOI, M.; AIHARA, E.; NAKASHIMA, M.; TAKEUCHI, K. Participation of prostaglandin receptor EP<sub>4</sub> subtype in duodenal bicarbonate secretion in rats. **American Journal of Physiology**, v. 287, p. 96 – 103, 2004.

ARRAIS, P.S.D.; COELHO, H.L.L.; BATISTA, M.C.D.S.; CARVALHO, M.L.; RIGHI, R.E.; ARNAU, J.M. Perfil da automedicação no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 31, p. 71-77, 1997.

AVILA, J.R.; LA LASTRA C.; MARTIN, M.J.; MOTILVA, V.; LUQUE I.; DELGADO, D.; ESTEBAN, J.; HERRERIAS, J. Role of endogenous sulphhydryls and neutrophil infiltration in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by piroxicam in rats. **Inflammation Research**, v. 45, p. 83 – 88, 1996.

BAGGIO, C.H.; OTOFUJI, G.M.; GARCIA, T.L.C.; FREITAS, C.S.; NAKASHIMA, T.; TORRES, L.M.B.; LAGO, J.H.G.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A.; MESIAVELA, S. Antiulcer effect of *Achillea millefolium* L. extracts. In: SINGH, V.K.; GOVIL, J.N.; AHMAD, K.; SHARMA, R.K. **Recent Progress in Medicinal Plants**. Texas, USA: Studium Press, 2005. p. 235-251.

BAGGIO, H.C. **Mecanismos envolvidos na atividade gastroprotetora do extrato aquoso das folhas de *Achillea millefolium* L.** 150f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

BAGGIO, C.H., FREITAS, C.S., NHADUCUE, P.F., RIECK, L., MARQUES, M.C.A. Action of crude aqueous extract of leaves of *Achillea millefolium* L. (Compositae) on gastrointestinal tract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p. 31 – 33, 2002.

BANDYOPADHYAY, D.; BISWAS, K.; BHATTACHARYYA, M.,; REITER, R.J; BANERJEE, R.K. Gastric Toxicity and Mucosal Ulceration Induced by Oxygenderived Reactive Species: Protection by Melatonin. **Current Molecular Medicine**, v. 1, p. 501-513, 2001.

BAYIR, H. Reactive oxygen species. **Critical Care Medicine**, v. 33, p. 498-501, 2005.

BEALES, I.L.P. Gastrin and interleukin-1b stimulate growth factor secretion from cultured rabbit gastric parietal cells. **Life Sciences**, v. 75, p. 2983 - 2995, 2004.

BENEDEK, B. *Achillea millefolium* L. s.l. – **Analysis of phenolic compounds and biological testing**. Tese PhD, University of Vienna, 2007.

BENEDEK, B.; KOOP, B. *Achillea millefolium* L. s.l. revisited: Recent findings confirm the traditional use. **Wien Med Wochenschr**, v. 157, p. 312-314, 2007.

BILICI, M.; OZTURK, C.; DURSUN, H.; ALBAYRAK, F.; SAGLAM, M.B.; UYANIK, A.; GULABOGLU, M.; TEKIN, S.B. Protective Effect of Mirtazapine on Indomethacin-Induced Ulcer in Rats and Its Relationship with Oxidant and Antioxidant Parameters. **Digestive Diseases and Sciences**, 2008.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, p. 1199 - 1200, 1958.

BRUNTON, L.L.; LAZO, J.S.; PARKER, K.L. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. United States of America: Mc Graw-Hill Companies, Inc., 2006.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, v. 36, p. 1007 -1023, 2001.

CANDAN, F.; UNLU, M.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A.; AKPULAT, H.A. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extract of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 215 – 220, 2003.

CARVALHO, A.S.T. Úlcera péptica. **Jornal de Pediatria**, v. 76, p. 127 – 134, 2000.

CAVALCANTI, A.M.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; RIECK, L.; SOUSA, R.S.; SANTOS, J.E.S.; VELA, S.M.; MARQUES, M.C.A. Safety and antiulcer efficacy studies *Achillea millefolium* L. after chronic treatment in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, p. 277 -284, 2006.

CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; ROOS, K.L.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. COX-3, a cicloxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure and expression. **Proceedings of the National Academy Sciences**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHEN, F.A.; WU, A.B.; CHEN, C.Y. The influence of treatments on the free radical scavenging activity of burdock and variations of its activity. **Food Chemistry**, v. 86, p. 479 -484, 2004.

CNUBBEN, N.H.P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J.; BLADEREN, P.J. The interplay of glutathione-released process in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 10, p. 141 – 152, 2001.

DANGELO, J.G; FATTINI, C.A. **Anatomia humana sistêmica e segmentar**. São Paulo: Editora Atheneu, 2007.

DENGIZ, G.O.; ODABASOGLU, F.; HALICI, Z.; CADIRCI, A.; SULEYMAN, H. Gastroprotective and Antioxidant Effects of Montelukast on Indomethacin-Induced Gastric Ulcer in Rats. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 105, p. 94 – 102, 2007.

DEVI, R.S.; NARAYAN, S.; VANI, G.; DEVI, C.S.S. Gastroprotective effect of *Terminalia arjuna* bark on diclofenac sodium induced gastric ulcer. **Chemico-Biological Interactions**, v. 167, p. 71 -83, 2007.

DIAS, B.F.S. **A implementação da convenção sobre a diversidade biológica no Brasil**: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello, 1996.

DING, M.; KINOSHITA, Y.; KISHI, K.; NAKATA, H.; HASSAN, S.; KAWANAMI, C. et al. Distribution of prostaglandin E receptors in the rat gastrointestinal tract. **Prostaglandins**, v. 53, p. 199 – 216, 1997.

DONG, M.H.; KAUNITZ, J.D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 22, p. 599 – 606, 2006.

FABRICANT, D.S.; FARNSWORTH, N.R. The values of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, sup. 1, 2001.

FERREIRA, M.P.; NISHIJIMA, M.; SEITO, L.N.; DOKKEDAL, A.L.; FERREIRA, M.L.; STASI, L.C.; VILEGAS, W.; LIMA, C.A.H. Gastroprotective effect of *Cissus sicyoides* (Vitaceae): Involvement of microcirculation, endogenous sulfhydryls and nitric oxide. **Journal of Ethnopharmacology**, Ethnopharmacological Communication, 2008.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 42, p. 153 -164, 2007.

FRIDOVICHI, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? **Annals of the New York Academy of Science**, v. 893, p. 13 -18, 1999.

FRIDOVICH, I. Biological effects of the superoxide radical. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 15, p. 1 – 11, 1986.

FONT QUER, P. **Plantas Medicinales**: el discórides renovado. Labor: Calábria, 1988.

GAO R, YUAN Z, ZHAO Z, GAO X. Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 41 - 45, 1998.

GERSHON, M.D.; KIRCHGEISSNER, A.L.; WADE, P.R. Functional anatomy of the enteric nervous system. In: JOHNSON, L.R. **Physiology of the gastrointestinal tract**. New York: 1994, p.381 - 422.

GLAVIN, G.B.; SZABO, S. Experimental gastric mucosal injury: laboratory models reveal mechanisms of pathogenesis and new therapeutic strategies. **The FASEB Journal**, v. 6, 1992.

GRISHAM, M.B.; HERNANDEZ, L.A.; GRANGER, D.N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **American Journal of Physiology**, v. 251, p. 567 – 574, 1986.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiología médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 715-723.

HAYES, J.D.; MCLELLAN, L.I. Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defence against oxidative stress. **Free Radical Research**, v. 31, p. 273 -300, 1999.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v. 16, p. 33 -50, 1996.

HALLIWELL, B. Antioxidants: the basics – what they are and how to evaluate them. In: SIES, H. **Antioxidants in disease mechanisms and therapy**. New York: Academic Press, 1997; p. 3 - 20.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford, UK: Clarendon Press; 2006.

HERNANDEZ, L.A.; GRISHAM, M.B.; TWOHIQ, B.; ARFORS, K.E.; HARLAN, J.M.; GRANGER, D.N. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. **American Journal of Physiology**, v. 253, p. 699-703, 1987.

HOLZER, P. Neural emergency system in the stomach. **Gastroenterology**, v. 114, p. 823- 839, 1998.

INEU, R.P.; PEREIRA, M.E.; ASCHNER, M.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G.; ROCHA, J.B.T. Diphenyl diselenide reverses gastric lesions in rats: Involvement of oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3023 – 3029, 2008.

ISHIHARA, M.; KOJIMA, R.; ITO, M. Influence of aging on gastric ulcer healing activities of the antioxidants  $\alpha$ -tocopherol and probucol. **European Journal of Pharmacology**, v. 601, p. 143-147, 2008.

JACOB, R.A.; BURRI, B.J. Oxidative damage and defense. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, 1996.

JAHOVIC, N.; ERKANLI, G.; ISERI, S.; ARBAK, S.; ALICAN, I. Gastric protection by  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone against ethanol in rats: Involvement of somatostatina. **Life Sciences**, v. 80, p. 1040 - 1045, 2007.

JAIN, K.S.; SHAH, A.K.; BARIWAL, J.; SHELKE, S.M.; KALE, A.P.; JAGTAP, J.R.; BHOSALE, A.V. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 1181 – 1205, 2007.

KAGAWA, S.; AOI, M.; KUBO, Y.; KOTANI, T.; TAKEUCHI, K. Stimulation by capsaicin of duodenal  $\text{HCO}_3$  secretion via afferent neurons and vanilloid receptors in rats. Comparison with acid-induced  $\text{HCO}_3$  response. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 48, p. 1850 -1856, 2003.

KIRKMAN, H.N.; GAETANI, G.F. Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, p. 4343 – 4347, 1984.

KIRKMAN, H.N.; ROLFO, M. FERRARIS, A.M. GAETANI, G.F. Mechanism of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 13908 – 13914, 1999.

KIMURA, M., et al. Impairment of glutathione metabolism in human gastric epithelial cells treated with vacuolating cytotoxin from *Helicobacter pylori*. **Journal of Pathology and microbiology**, v. 31, p. 29 – 36, 2001.

KLAASSEN, C.D.; BRACKEN, W.M.; DUDLEY, R.E.; GOERING, P.L.; HAZELTON, G.A.; HJELLE, J.J. Role of sulfhydryls in the hepatotoxicity of organic and metallic compounds. **Fundamental and Applied Toxicology**, v. 5, p. 806 – 815, 1985.

KOBAYASHI T, OHTA Y, YOSHINO J, NAKAZAWA S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 23 - 30, 2001.

KOCEVAR, N.; GLAVAC, I.; INJAC, R.; KREFT, S. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. **Journal of Pharmacology Biochemistry Analytical**, v. 46, p. 609 – 614, 2008.

KOCH, O.R.; PANI G.; BORRELLO S.; COLAVITTI, R.; CRAVERO, A.; FARR, S.; GALEOTTI, T. Oxidative stress and antioxidant defenses in ethanol induced cell injury. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, p. 91 – 198, 2004.

KONTUREK, P.C.; KONTUREK, S.J.; OCHMANSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H<sup>+</sup> and duodenal HCO<sub>3</sub> secretion: the role of brain-gut axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, p. 15 – 27, 2004.

KONYALIOGLU, S.; KARAMENDERES, C. The protective effects of *Achillea* L. species native in Turkey against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage in human erythrocytes and leucocytes. **Journal of Etnopharmacology**, v. 102, p. 221-227, 2005.

LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; LA LASTRA, C.A.; MOTILVA, V.; CALERO, M.J.M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Etnopharmacology**, v. 71, p. 45 – 53, 2000.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric mucosal defense and cytoprotection: bench to bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41 – 60, 2008.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, S2:S4, 2008.

LEIER, I.; JEDLITSCHKY, G.; BUCHHOLZ, U.; CENTER, M.; COLE, S.P.; DEELEY, R.G.; KEPPLER, D. ATP-dependent glutathione disulphide transport mediated by the MRP gene-encoded conjugate export pump. **Biochemical Journal**, v. 314, p. 433 – 437, 1996.

LORENZI, H.; MATTOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MARKLUND S, MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol: an convenient assay for superoxide dismutase enzyme activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, p. 469 - 474, 1974.

LU, S.C. Regulation of glutathione synthesis. **Curr.Topics Cell. Regulation**. v. 36, p.95 - 116, 2000.

MARTINS, M.B.G.; MARTINS, A.R.; TELASCRÊA, M.; CAVALHEIRO, A.J. Caracterização anatômica da folha de *Cympopogon citratus* Stapf. (POACEAE) e perfil químico do óleo essencial. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, p. 20 – 29, 2004.



MARXEN, K.; VANSELOW, K.H.; LIPPEMEIER, S.; HINTZE, R.; RUSER, A.; HANSEN, U. Determination of DPPH Radical Oxidation Caused by Methanolic Extracts of Some Microalgal Species by Linear Regression Analysis of Spectrophotometric Measurements. **Sensors**, v. 7, p. 2080 – 2095, 2007.

MATSUHASHI, T.; OTAKA, M.; ODASHIMA, M.; JIN, M.; KOMATSU, K.; WADA, I.; HORIKAWA, Y.; OHBA, R.; OYAKE, J.; HATAKEYAMA, N.; WATANABE, S. Protective effect of a novel rice extract against ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 52, p. 434 – 441, 2007.

McCORD, J.M. Human disease, free radical, and the oxidant/antioxidant balance. **Clinical Biochemistry**, v. 26, p. 351 – 357, 1993.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). **Free Radical Biology e Medicine**, v. 5, p. 363 – 369, 1988.

MERCHANT, J.L. Tales from the crypts: regulatory peptides and cytokines in gastrointestinal homeostasis and disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, p. 6 – 12, 2007.

MITICH, L.W. Intriguing world of weeds: Yarrow – the herb of Achilles. **Weed Technology**, v. 4, p. 451 – 453, 1990.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, p. 211 – 219, 2004.

MOTAWI, T.K.; ELGAWAD, H.M.A. SHAHIN, N.N. Gastroprotective effect of leptin in indomethacin-induced gastric injury. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 15, p. 405 – 412, 2008.

MOTILVA, V.; MARTÍN, M.J.; LUQUE, M.I.; ALARCÓN de la Lastra C. Role of polymorphonuclear leukocytes and oxygen-derived free radicals in chronic gastric lesion induced by acetic acid in rat. **General Pharmacology**, v. 27, p. 545 – 550, 1996.

MULTHAUP, G.; RUPPERT, T.; SCHLICKSUPP, A.; HESSE, L.; BEHER, D.; MASTERS, C.L.; BEYREUTHER, K. Reactive oxygen species and Alzheimer's disease. **Biochemistry Pharmacology**, v. 54, p. 533 – 539, 1997.

NAKASHIMA, M.; AOI, M.; AIHARA, E.; TAKEUCHI, K. No role for prostacyclin IP receptors in duodenal HCO<sub>3</sub> secretion induced by mucosal acidification in mice: comparison with capsaicin-induced response. **Digestion**, v. 70, p. 16 – 25, 2004.

NARUMIYA, S. Prostanoid receptors. Structure, function and distribution. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 744, p. 126 – 138, 1994.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Biodiversidade: Aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P. de; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/ Florianópolis: Universidade UFRGS, Editora da UFSC, 2000.

NORDBERG, J.; ARNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 31, p. 1287 – 1312, 2001.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y.; HALICI, M.; KAZAZ, C. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p. 59 – 65, 2006.

OKABE, S.; PFEIFFER, C.J. Chronicity of acetic acid ulcer in the rat stomach. **American Journal of Physiology**, v. 17, p. 619 – 629, 1972.

OKABE, S.; ROTH, L.A.; PFEIER, J. A method of experimental penetrating gastric and duodenal; ulcers in rats. **American Journal of Digestive Diseases**, v. 16, p. 277 – 280, 1971.

OLSEN, P.S.; THERKELSEN, K.; POULSEN, S.S. Effect of Omeprazole and Cimetidine on Healing of Chronic Gastric Ulcers and Gastric Acid Secretion in Rats. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 155, p. 305 – 310, 1988.

OURY, T.D.; DAY, B.J.; CRAPO, J.D. Extracellular superoxide dismutase in vessels and airways of humans and baboons. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 20, p. 957 – 965, 1996.

PAN, J.S.; HE, S.Z.; XU, H.Z.; ZHAN, X.J.; YANG, X.N.; XIAO, H.M.; SHI, H.X.; REN, J.L. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, p. 5857 – 5867, 2008.

PASRICHA, P.J. Procinéticos, antieméticos e agentes usados na síndrome do intestino irritável. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: Mac Graw Hill, 2006.

PIRES, J.M.; MENDES, F.R.; NEGRI, G.; ALMEIDA, J.M.D.; CARLINI, E.A. Antinociceptive peripheral effect of *Achillea millefolium* L. and *Artemisia vulgaris* L.: Both plants known popularly by brand names of analgesic drugs. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 212 – 219, 2009.

RAHA, S.; ROBINSON, B.H. Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, p. 502 – 508, 2000.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

RAUDONIS, R.; JAKSTAS, V.; BURDULIS, D.; BENETISI, R.; JANULIS, V. Investigation of contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn HPLC method. **Medicina**, v. 45, 2009.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v. 77, p. 433 – 443, 1979.

ROULEAU, A.; HE´RON, A., COCHOIS, V.; PILLOT, C.; SCHWARTZ, J.C.; ARRANG, J.M. Cloning and expression of the mouse histamine H3 receptor: evidence for multiple isoforms. **Journal of Neurochemistry**, v. 90, p. 1331 -1338, 2004.

SAKURAI, K.; OSAKA, T. YAMASAKI, K. Rebamipide reduces recurrence of experimental gastric ulcer: role of free radicals and neutrophils. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 90 – 96, 2005.

SCHUBERT, M.L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, p. 636 -643, 2005.

SCHUBERT, M.L.; PEURA, D.A. Control of gastric acid secretion in health and disease. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1842 – 1860, 2008.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, p. 192 -205, 1988.

SEIDL, P.R. Prospects for Brazilian natural products. In: **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 1999, p. 239-247.

SMITH, W.L.; GARAVITO, M.; DEWITT, D. Prostaglandin endoperoxide H sintase (cicloxygenases) -1 e -2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 33157-33160, 1996.

SUGAMOTO, S.; KAWAUCHI, S.; FURUKAWA, O.; TAKEUCHI, K. Interactive roles of endogenous nitric oxide and prostaglandins in acid-induced bicarbonate response in rat duodenum. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 46, p. 1208 – 1216, 2001.

TAKEUCHI, K.; KONAKA, A.; NISHIJIMA, M.; KATO, S.; YASUHIRO, T. Effects of pantoprazole, a novel H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase inhibitor, on duodenal ulcerogenic and healing responses in rats: A comparative study with omeprazole and lansoprazole. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 14 p. 251 - 257, 1999.

TAKEUCHI, K.; UKAWA, H.; FURUKAWA, O.; KAWAUCHI, S.; ARAKI, H. SUGIMOTO, Y.; ISHIKAWA, A.; USHIKUBI, F.; NARUMIYA, S. Prostaglandin E receptor subtypes involved in stimulation of gastroduodenal bicarbonate secretion in rats and mice. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 50, p. 155 -167, 1999.

TAKEUCHI, K.; UESHIMA, K.; HIRONAKA, Y.; FUJIOKA, Y.; MATSUMOTO, J.; OKABE, S. Oxygen free radicals and lipid peroxidation in the pathogenesis of gastric mucosal lesions induced by indomethacin in rats: relation to gastric hypermotility. **Digestion**, v. 49, p. 175 – 184, 1991.

TANI, S.; OKUDA, M.; MORISHIGE, R.; TANAKA, T. Gastric mucin secretion from cultured rat epithelial cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 20, p. 482 – 485, 1997.

TARIQ, K.A.; CHISHTI, M.Z.; AHMAD, F.; SHAWL, A.S. Anthelmintic efficacy of *Achillea millifolium* against gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Helminthology**, v. 82, p., 227 – 233, 2008.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and Molecular Mechanisms of Gastrointestinal Ulcer Healing. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 24 – 33, 2005.

TATSUMI, Y. Effect of oxygen radicals on mucosal lesions and glycoprotein metabolism in rat gastric mucus during ulcer formation induced by subserosa acetic acid injection. **J Kyoto Pref Univ Med**, v. 99, p. 1461 - 1479, 1990.

VUYYURU, L.; SCHUBERT, M.L.; HARRINGTON, L.; ARIMURA, A.; MAKHLOUF, G.M. Dual inhibitory pathways link antral somatostatin and histamine secretion in human, dog, and rat stomach. **Gastroenterology**, v. 109, p. 1566 – 1574, 1995.

YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, 2006.

YUNES, R.A.; FILHO, V.C. Breve análise histórica da química de plantas medicinais: sua importância na atual concepção de fármacos segundo os paradigmas ocidental e oriental. In: YUNES R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais: sob a ótica da química moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: Why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547 – 1565, 2008.

WALLACE, J.L. Mechanisms of Protection and Healing: Current Knowledge and Future Research. **American Journal Medicine**, v. 110, p. 19 – 23, 2001.